
Die Rolle der Zellmembran-Asymmetrie in der Aktivierung von ADAM17

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Martin Veit

Kiel, 2019

Erster Gutachter: Prof. Dr. Thomas Roeder

Zweite Gutachterin: Prof. Dr. Karina Reiß

Tag der mündlichen Prüfung: 23.05.2019

Zum Druck genehmigt: 23.05.2019

Gez. Prof. Dr. Frank Kempken, Dekan

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis.....	A
Abkürzungsverzeichnis.....	D
1 Einleitung.....	1
1.1 Die Zellmembran.....	1
1.1.1 Aufbau.....	1
1.1.2 Aufbau und Aufrechterhaltung der Zellmembran-Asymmetrie.....	3
1.1.3 Physiologische Bedeutung einer Phosphatidylserin-Externalisierung.....	4
1.2 Anoctamin-/TMEM16-Familie.....	6
1.2.1 Vorkommen und Bedeutung der Anoctamine.....	6
1.2.2 Anoctamin-6 – eine kalziumabhängige Scramblase.....	7
1.3 Disintegrin-ähnliche Metalloproteasen.....	10
1.3.1 Struktur von ADAM17.....	11
1.3.2 Regulation der Shedding-Aktivität von ADAM17.....	12
1.3.3 ADAM17 im physiologischen und pathophysiologischen Kontext.....	14
2 Zielsetzung.....	17
3 Material und Methoden.....	18
3.1 Materialien.....	18
3.2 Chemikalien.....	19
3.3 Enzyme.....	21
3.4 Kits.....	22
3.5 Geräte.....	22
3.6 Antikörper.....	23
3.6.1 Primäre Antikörper.....	23
3.6.2 Sekundäre Antikörper.....	24
3.7 Plasmide.....	24
3.8 Software.....	25
3.9 ADAM17-3x-Mausmodell.....	25
3.9.1 Genotypisierung von Mäusen und Mäuseembryonen.....	26
3.9.2 Präparation von primären Hepatozyten.....	27
3.9.3 Präparation von primären Fibroblasten.....	27
3.10 Zelllinien.....	28
3.11 Kultivierung von Zellen.....	28
3.11.1 Beschichtung von Zellkulturmaterialien.....	29
3.11.2 Zellzahlbestimmung.....	30
3.11.3 Kryokonservierung.....	30
3.11.4 Transiente Transfektion.....	31

3.11.5	Inhibition und Stimulation in Zellkulturexperimenten.....	31
3.12	Zellbiologische Methoden	33
3.12.1	Alkalischer Phosphatase Assay.....	33
3.12.2	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)	34
3.12.3	Fluoreszenz-Peptidsubstrat-Assay.....	34
3.12.4	Fluoreszenzfärbung	35
3.12.5	Quantifizierung von Fluoreszenzsignalen.....	36
3.13	Proteinbiochemische Methoden.....	37
3.13.1	Proteinextraktion aus Zellen	37
3.13.2	Quantifizierung des Proteingehaltes.....	37
3.13.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	38
3.13.4	<i>Western Blot</i>	39
3.13.5	Immunologische Detektion	40
3.13.6	<i>Strippen</i> der PVDF-Membran	41
3.14	Kultivierung von Bakterien	41
3.14.1	Kryokonservierung	42
3.14.2	Transformation von Bakterien	42
3.15	Molekularbiologische Methoden	43
3.15.1	Plasmidpräparation	43
3.15.2	Quantifizierung von DNA.....	43
3.15.3	Mutation von Plasmidvektoren.....	43
3.15.4	Agarose-Gelelektrophorese	43
3.15.5	DNA-Sequenzierung	44
3.16	Statistik.....	44
4	Ergebnisse	45
4.1	Einfluss von Anoctamin-6 auf die ADAM17-vermittelte Substratfreisetzung.....	45
4.1.1	Die Überexpression von Anoctamin-6 führt zu einer verstärkten Phosphatidylserin-Externalisierung.....	46
4.1.2	Das ADAM17-vermittelte Shedding von AREG- und TGF-alpha wird durch Anoctamin-6 in Abhängigkeit von Phosphatidylserin erhöht	48
4.1.3	ATP und Melittin verstärken die Shedding-Aktivität von ADAM10 und ADAM17 durch Anoctamin-6.....	54
4.1.4	Die Proteinkinase C-abhängige Aktivierung von ADAM17 ist unabhängig von Anoctamin-6.....	56
4.2	Die Phosphatidylserin-Externalisierung ist ein essenzieller Mechanismus zur Aktivierung von ADAM17	58
4.2.1	Generierung und Charakterisierung der Anoctamin-6-D408G-eGFP-Mutante	59
4.2.2	Anoctamin-6-D408G verstärkt das ADAM-vermittelte Shedding unabhängig von Stimulanzen	61
4.3	Die in vivo-Relevanz des Phosphatidylserin-bindenden RKGK-Motivs von ADAM17	64

4.3.1	Die Mutation des RKGK-Motivs führt zu einer pränatalen Letalität	65
4.3.2	Die ADAM17-Expression und Zelloberflächenlokalisation ist unverändert	67
4.3.3	Die ADAM10-Expression ist unverändert.....	69
4.3.4	Die Interaktion von Phosphatidylserin und dem RKGK-Motiv ist essenziell für die Shedding-Aktivität von ADAM17.....	70
5	Diskussion	74
5.1	Anoctamin-6 reguliert kalziumabhängig die ADAM10- und ADAM17-Aktivität via Phosphatidylserin-Externalisierung.....	75
5.2	ADAM17 kann durch andere Signalwege unabhängig von Anoctamin-6 aktiviert werden..	79
5.3	Phosphatidylserin ist essenziell für die Aktivität von ADAM17 in vivo	82
5.4	Ausblick.....	86
6	Zusammenfassung	88
7	Summary	90
8	Literaturverzeichnis	I
9	Abbildungsverzeichnis	XXII
10	Tabellenverzeichnis.....	XXIV
11	Anhang	XXV
11.1	Sequenzhomologie zwischen Anoctamin-1 und Anoctamin-6.....	XXV
11.2	Vektorkarte pcDNA3.1 Anoctamin-6-eGFP	XXVI
11.3	Sequenzhomologie zwischen murinem und humanen Anoctamin-6	XXVII
11.4	Sequenzierung der Anoctamin-6-D408G-Mutanten	XXVIII
11.5	ADAM17-3x-Mausmodell	XXIX
12	Publikationen	XXX
13	Erklärung.....	XXXI

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent
ABB	<i>Annexin binding buffer</i>
ADAM	<i>A disintegrin and metalloprotease</i>
AEBSF	<i>4-(2-Aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride hydrochloride</i>
AKT	Proteinkinase B
ANO	Anoctamin
ANO6	Anoctamin-6
ANOVA	<i>Analysis of variance/Varianzanalyse</i>
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AREG	Amphiregulin
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	<i>Bovine serum albumin/Rinderserumalbumin</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA/DNS	<i>Desoxyribonucleic acid/Desoxyribonukleinsäure</i>
dNTP	Desoxyribonukleosidphosphate
DTT	Dithiothreitol
E14/16/18	Embryonaltag 14/16/18
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
Et al.	Und andere
FCS	<i>Fetal calf serum/</i> Fetales Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GI	GI254023X
GPCR	<i>G Protein-coupled receptor/G-Protein gekoppelter Rezeptor</i>
GW	GW280264X
IL-6	Interleukin-6
IO	Ionomycin
IVC	<i>Individually ventilated cage/Individuell ventilierter Käfig</i>
MEF	<i>Murine embryonic fibroblasts/Embryonale Mausfibroblasten</i>
MEH	<i>Murine embryonic hepatocytes/</i> Embryonale Maushepatozyten

Mel	Melittin
MM	Marimastat
MPD	Membranproximale Domäne
OPS	O-phospho-L-Serin
P/S	Penicillin/Streptomycin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PC	Phosphatidylcholin
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> /Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phosphatidylethanolamin
PFA	Paraformaldehyd
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12-myristate-13-acetat
PS	Phosphatidylserin
R	Rezeptor
Rpm	<i>Rounds per minute</i> / Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	<i>Standard error of the mean</i> Standardfehler des Mittelwertes
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGF α	<i>Transforming growth factor α</i>
TMD	Transmembrandomäne
TMEM16	Transmembranprotein 16
TNF	Tumornekrosefaktor
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
WT	Wildtyp

1 EINLEITUNG

1.1 DIE ZELLMEMBRAN

Die Zellmembran, u.a. auch Plasmamembran oder Biomembran genannt, stellt die äußere Barriere einer Zelle dar und trennt das Zytoplasma und die darin enthaltenen Kompartimente von der Umwelt ab (Kirkpatrick, 1979). Sie hat eine vielfältige Bedeutung: zum einen ist sie die erste Schutzinstanz gegenüber exogenen Faktoren und zum anderen ist sie ein zentraler Punkt der Regulation des Transports von z.B. Nährstoffen oder *second messengers* (Bever und Williamson, 2016; Muallem u. a., 2017; Rasmussen, 1970). Ein ebenso relevanter Punkt ist der Aufbau von ionischen Gradienten und damit der Grundstein der Signaltransduktion mit Hilfe des daraus entstehenden Membranpotenzials (Blaustein und Goldring, 1975; Fairless u. a., 2013).

Trotz dieser abgrenzenden Funktionen stellt die Membran kein starres Gebilde dar. 1972 wurde erstmal die Hypothese des „flüssigen Mosaiks“ durch Singer und Nicolson aufgestellt (Singer u. a., 1972). Diese postulierte, dass die Zellmembran durch ihre verschiedenen Interaktionen zwischen Lipiden und Proteinen einem ständigen Wandel unterzogen ist und sich situationsbedingt anpassen kann.

1.1.1 AUFBAU

Unser Verständnis der Zellmembran und die Funktionen ihrer Bestandteile hat sich im Laufe des letzten Jahrhunderts stark gewandelt. Die Auffassung, dass es sich bei der Membran um eine Lipiddoppelschicht handelt, setzte sich in den 60er und 70er Jahren durch (Bean u. a., 1968, 1969; Bretscher, 1972). Diese Erkenntnis beinhaltet, dass die Zellmembran durch eine hydrophobe Phase im Inneren, welche durch die aliphatischen Ketten der Lipide gekennzeichnet ist, und den nach außen gewandten hydrophilen Bereichen, welche durch die geladenen Kopfgruppen gebildet werden, aufgebaut ist. Dabei sind die in der Membran auftretenden Lipide äußerst heterogen und bis heute sind bereits mehrere Tausend beschrieben (Fahy u. a., 2009; Nelson, 1967). Neben diesen Lipiden weisen Zellmembranen ein bis zu 50 %igen Proteinanteil auf (Alberts u. a., 2002; Fairbanks u. a., 1971).

Das Verständnis erweiterte sich Anfang der 70iger Jahre damit, dass eine asymmetrische Verteilung der am häufigsten auftretenden Phospholipide nachgewiesen wurde (Bangham, 1968; Bretscher, 1972; Verkleij u. a., 1973). Der Gehalt der Phospholipide und deren

Verteilung variiert je nach Zelltyp, doch die grundsätzliche Asymmetrie dieser Lipide ist ein Kennzeichen einer intakten Membran (Kobayashi u. a., 2002; van Meer und de Kroon, 2011). Phosphatidylethanolamine (PE) und Phosphatidylserin (PS) treten im Grundzustand vorrangig auf der zytosolischen Seite und Phosphatidylcholin (PC) und Sphingomyeline auf der extrazellulären Seite auf (Tabelle 1).

Tabelle 1: Verteilung der Phospholipide innerhalb der Zellmembran

Phospholipide	Anteil am Lipidgehalt der Membran [%]	Anteil des Phospholipids auf der cytosolischen Membranseite [%]	Anteil des Phospholipids auf der extrazellulären Membranseite [%]
Phosphatidyl-ethanolamin (PE)	5 - 20	~80	~20
Phosphatidylserin (PS)	4 - 7	~99	~1
Phosphatidylcholin (PC)	15 - 25	~20	~80
Sphingomyelin	15 - 20	~20	~80
Andere	10 - 25	/	/

Adaptiert nach (Alberts u. a., 2002; Seigneuret und Devaux, 1984; Spector und Yorek, 1985; Verkleij u. a., 1973)

Neben der Erkenntnis, dass es sich bei der Zellmembran um kein starres, sondern um ein adaptives Gebilde handelt, war auch die Beobachtung von cholesterolhaltigen und detergenzresistenten Domänen, sogenannten *lipid rafts*, ein weiterer Meilenstein (Sezgin u. a., 2017; Yu u. a., 1973). Die Definition der *lipid rafts* veränderte sich im Laufe der Zeit anhand von immer gezielteren Detektionsmöglichkeiten mit denen die Aufklärung und Charakterisierung dieser Nanodomänen verbessert wurde (Simons und Gerl, 2010; Simons und Toomre, 2000). Nach heutigem Wissensstand sind diese als dynamische, kleine Domänen mit einem erhöhten Anteil von Cholesterol und ähnlichen Lipiden und einer Vielzahl an unterschiedlichen Markern, u.a. GM1, charakterisiert (Daniel und Kai, 2010).

Die Aufklärung der Zellmembranstruktur ermöglicht ein breites Verständnis physiologischer Vorgänge. Die vielfältigen Funktionen und deren adaptive Natur lassen sich heute dadurch erklären, dass nicht nur eine vertikale Mobilität sondern auch eine horizontale Bewegung innerhalb der Membran möglich ist und deshalb eine Vielzahl von Interaktionsmöglichkeiten bestehen (Kraft, 2013).

1.1.2 AUFBAU UND AUFRECHTERHALTUNG DER ZELLMEMBRAN-ASYMMETRIE

Die Asymmetrie der Phospholipide ist ein Kennzeichen einer intakten Zellmembran. Die Natur von chemischen Verbindungen entspricht jedoch einem angestrebten Gleichgewichtszustand und somit dem Drang ihren Konzentrationsgradienten auszugleichen. Durch den amphipathischen Aufbau der Membran ist es den Phospholipiden aufgrund ihrer hydrophilen Kopfgruppe nicht möglich den hydrophoben Kern zu überwinden und auf die andere Seite der Membran zu gelangen. Die eigenständige Bewegung eines Phospholipids durch die Lipid-doppelschicht ist ein sehr langsamer Prozess und beträgt am Beispiel von PC etwa 6,5 h (McConnell und Kornberg, 1971).

Eine Möglichkeit diese Barriere zu überwinden ist die Blockade der hydrophilen Kopfgruppe mit Hilfe von chemischen Verbindungen, u.a. Cholaten, und einer dadurch vereinfachten Diffusion (Boon u. a., 2003). Nachweislich führen auch eine Formation von Poren, u.a. durch chemische Komponenten, transiente Wasserporen oder Umbauprozesse innerhalb der Membran zu einer Diffusion dieser Phospholipide (Van Den Bogaart u. a., 2008; Gurtovenko u. a., 2010). Im Gegensatz dazu wird die Regulation der Phospholipid-Asymmetrie auf zellulärer Ebene durch integrale Proteine gesteuert. Hierbei werden Flippasen, Floppasen und Scramblasen unterschieden (Abbildung 1).

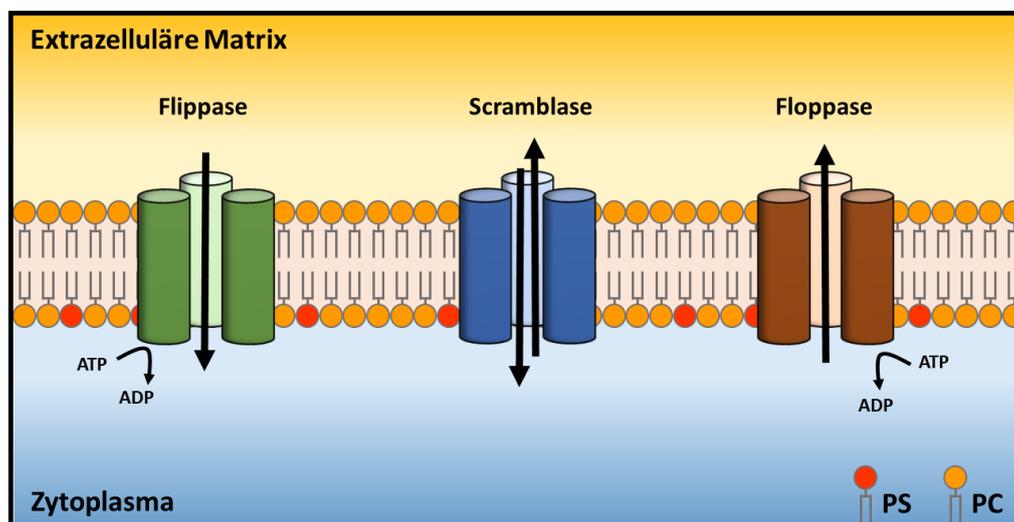


Abbildung 1: Mechanismen zum Aufbau und der Aufrechterhaltung der Zellmembran-Asymmetrie. Schematische Darstellung des Phospholipidtransportes innerhalb der Zellmembran. Flippasen (grün) sind Proteine, die Lipide unter Energieverbrauch von der extrazellulären zur intrazellulären Seite der Membran transportieren. Scramblasen (blau) können energieunabhängig Phospholipide bidirektional entlang ihres Gradienten transportieren und führen somit zu einem Mischeffekt innerhalb der Membran. Floppasen (braun) transportieren Lipide von der intrazellulären zur extrazellulären Seite der Zellmembran unter Verbrauch von ATP.

Sowohl Flippasen als auch Floppasen gehören zu der Familie der ABC-Transporter und unterscheiden sich grundsätzlich in der Richtung ihres Transportes (Clark, 2011; van Meer und de Kroon, 2011). Flippasen, denen die Mitglieder der Familie der P4-ATPasen angehören, transportieren in Abhängigkeit von ATP Phospholipide, wie PE und PS, von der extrazellulären zur intrazellulären Seite der Membran und bauen dadurch deren Asymmetrie auf (Lopez-Marques u. a., 2014; Sebastian u. a., 2012). Floppasen hingegen transportieren Phospholipide, wie PC und Sphingomyeline, ebenfalls unter ATP-Verbrauch auf die extrazelluläre Seite der Membran (Montigny u. a., 2016). Im Gegensatz zu diesen zwei Arten von Transportern stehen die Scramblasen, zu denen Anoctamin-6 (ANO6) und XKR8 zählen. Diese Proteinklasse transportiert Lipide energieunabhängig und entlang ihres Gradienten jedoch mit einer geringeren Substratspezifität als Flipp- und Floppasen (Holthuis und Levine, 2005; Nagata u. a., 2016).

Somit erzeugen Flippasen und Floppasen im zellulären Kontext die Zellmembran-Asymmetrie und halten diesen Zustand aufrecht, wohingegen Scramblasen durch die temporäre Aufhebung dieser Asymmetrie u.a. eine Signaltransduktion ermöglichen können (Bevers und Williamson, 2016).

1.1.3 PHYSIOLOGISCHE BEDEUTUNG EINER PHOSPHATIDYLSERIN-EXTERNALISIERUNG

Aus der Existenz der Membran-Asymmetrie leitet sich auch die daraus resultierende Frage ab: Welche physiologische Bedeutung hat eine ungleichmäßige Verteilung der Phospholipide innerhalb der Zellmembran? Bereits an dem hohen Anteil von Sphingomyelinen in der extrazellulären Seite der Membran und dessen Bedeutung in der Formation von Nanodomänen, wie *lipid rafts*, lässt sich eine regulatorische Rolle erkennen (Brown und London, 2000).

Die vielseitige Relevanz einer temporären Auflösung der Membran-Asymmetrie wird anhand der Bedeutung einer PS-Externalisierung deutlich. Im Folgenden werden drei Mechanismen, denen die Exposition von PS zugrunde liegt, erläutert. Dies stellt jedoch nur ein Auszug aus einem breiten Spektrum von relevanten Mechanismen dar (Bevers und Williamson, 2016; Nagata u. a., 2016).

1) Zuerst ist die Apoptose wohl die am häufigsten mit einer PS-Exposition geknüpfte Verbindung. Bereits 1995 wurde die PS-Externalisierung als grundlegendes Kennzeichen in der frühen Phase der Apoptose nachgewiesen (Martin u. a., 1995). Das während des

programmierten Zelltodes exponierte PS dient der Erkennung durch Phagozyten mittels direkter und indirekter Bindung an PS-Rezeptoren und einer anschließenden Phagozytose der betroffenen Zelle (Bevern und Williamson, 2016; Fadok u. a., 2000). Weitere Erkenntnisse in diesem Feld zeigten, dass mittels Caspase-3 und -7 die Scramblase XKR8 aktiviert und dadurch die Membran-Asymmetrie aufgehoben wird (Mariño und Kroemer, 2013). Des Weiteren wurde deutlich, dass eine alleinige temporäre Exposition von PS nicht zur Apoptose führt, sondern Faktoren wie die Menge an exponiertem PS und eine gleichzeitige Deaktivierung der Flippasen ausschlaggebend für eine folgende Phagozytose sind (Segawa und Nagata, 2015).

2) Ein zweiter bereits ausführlich untersuchter Mechanismus, dem eine PS-Exposition zu Grunde liegt, ist die Blutkoagulation. Hierbei kommt es in Thrombozyten zu einer Aktivierung der PS-Externalisierung durch einen intrazellulären Anstieg der Kalziumkonzentration in Reaktion auf eine Thrombin- und Kollagen-Stimulation (Bevern u. a., 1982, 1983). Diesem Anstieg folgt eine Aktivierung der Scramblase-Funktion von ANO6 und der Exposition von PS (Wolfs u. a., 2005). Das nun auf der Oberfläche exponierte PS dient daraufhin der Erkennung und Bindung durch Faktoren der Gerinnungskaskade (De Witt u. a., 2014). Letztlich führt diese verstärkte Rekrutierung von an der Gerinnung beteiligten Proteinen zum Wundverschluss. Eine Mutation innerhalb dieser Scramblase mit der Folge eines nicht-funktionalen ANO6 führt zu einer verminderten Blutgerinnung und wird als Scott-Syndrom bezeichnet (Zwaal u. a., 2004).

3) Im Rahmen der Knochenmineralisierung wird einer PS-Exposition eine essenzielle Rolle in der Formation von Hydroxylapatit durch Matrixvesikel zugeschrieben. Hierbei soll PS durch dessen spezifische Bindung an Annexin V, welche nur in Abhängigkeit von Kalziumionen erfolgen kann, und eine anschließende Aufnahme dieses Komplexes in das Innere der Matrixvesikel zu einer verbesserten Kalziumaufnahme führen (Kirsch u. a., 1997). Diese soll anschließend zu einer verstärkten Mineralisierung beitragen, welche mit der Kristallbildung im Inneren der Matrixvesikel assoziiert ist (Wu u. a., 2008). Diese Hypothese wird durch die Beobachtung eines Knochenmineralisierungsdefekts in ANO6-defizienten Mäusen unterstützt. Hierbei wurde die Rolle von PS nicht explizit untersucht, sondern aufgrund der Scramblasefunktion von ANO6 vermutet (Ousingsawat u. a., 2015).

1.2 ANOCTAMIN-/TMEM16-FAMILIE

Die wohl am weitreichendsten erforschten Proteine hinsichtlich ihrer Scramblase-Aktivität sind die der Familie der Anoctamine auch Transmembranproteine 16 (TMEM16) genannt. Ursprünglich als Proteine mit acht Transmembrandomänen beschrieben, daher das Synonym Anoctamin (ANO), stellte sich anhand von Kristallstrukturanalysen heraus, dass sie zehn Transmembrandomänen beinhalten (Brunner u. a., 2014). Auch die anfänglich, anhand der Entdeckung von Anoctamin-1 und dessen Relevanz als spannungsabhängiger Ionenkanal, abgeleitete Funktion als kalziumabhängige Chloridkanäle wurde für die meisten Mitglieder durch neue Forschungsergebnisse verworfen (Scudieri u. a., 2012). Der Entdeckung der Scramblase-Aktivität von ANO6 folgend, änderte sich die Sicht auf diese Proteinfamilie und der Mechanismus der PS-Externalisierung wurde näher untersucht (Schreiber u. a., 2010; Tian u. a., 2012).

1.2.1 VORKOMMEN UND BEDEUTUNG DER ANOCTAMINE

Die Mitglieder der ANO-Familie wurden innerhalb der letzten Jahre intensiv hinsichtlich ihrer Ionenkanal-Funktion und Scramblase-Aktivität untersucht (Tabelle 2). Die Lokalisation und deren physiologische Bedeutung sind im Folgenden aufgelistet.

Tabelle 2: Mitglieder der Anoctamin/TMEM16-Familie und deren Bedeutung

Mitglied	Lokalisation	Funktion/Bedeutung	Quellen
Anoctamin-1; TMEM16A	Zellmembran	<ul style="list-style-type: none"> Calcium-aktivierter Chloridkanal 	(Ferrera u. a., 2011) (Stolz u. a., 2015) (Scudieri u. a., 2012) (Schreiber u. a., 2010)
Anoctamin-2; TMEM16B	Zellmembran	<ul style="list-style-type: none"> Calcium-aktivierter Chloridkanal Teil des präsynaptischen Photorezeptorkomplexes Signaltransduktion in olfaktorischen neuronalen Zellen 	(Pifferi u. a., 2012) (Stohr u. a., 2009) (Scudieri u. a., 2012) (Tian u. a., 2012)
Anoctamin-3; TMEM16C	Zellmembran	<ul style="list-style-type: none"> Scramblase-Aktivität (vorrangig für PC) Mutation von ANO3 führt zu zervikaler Dystonie 	(Charlesworth u. a., 2012) (Gyobu u. a., 2017) (Nagata u. a., 2016)
Anoctamin-4; TMEM16D	Zellmembran	<ul style="list-style-type: none"> Scramblase-Aktivität (für PS) 	(Tian u. a., 2012) (Gyobu u. a., 2017) (Nagata u. a., 2016)

Anoctamin-5; TMEM16E	Zellmembran; Endoplasmatisches Retikulum	<ul style="list-style-type: none"> • Mutation von ANO5 führt zu Muskeldystrophien und Knochenfrakturen 	(Marconi u. a., 2013) (Andreeva u. a., 2016) (Nagata u. a., 2016) (Gyobu u. a., 2017)
Anoctamin-6; TMEM16F	Zellmembran	<ul style="list-style-type: none"> • Scramblase-Aktivität (für PS und PC) • Kationenkanal • Mutation führt zu Scott-Syndrom; • Defizienz führt zu Knochenmineralisierungsdefekt in Mäusen 	(Fujii u. a., 2015) (Ousingsawat u. a., 2015) (Boisseau u. a., 2018) (Gyobu u. a., 2017)
Anoctamin-7; TMEM16G	Zellmembran; Endoplasmatisches Retikulum	<ul style="list-style-type: none"> • Scramblase-Aktivität (für PS und PC) • Überexpression in Assoziation mit Prostatakrebs 	(Duran u. a., 2012) (Kiessling u. a., 2005) (Bera u. a., 2004) (Gyobu u. a., 2017) (Suzuki u. a., 2013)
Anoctamin-8; TMEM16H	Zellmembran; Zytosol	<ul style="list-style-type: none"> • Möglicherweise Kationenkanal 	(Gyobu u. a., 2017) (Suzuki u. a., 2013) (Tian u. a., 2012)
Anoctamin-9; TMEM16J	Zellmembran	<ul style="list-style-type: none"> • Scramblase-Aktivität (für PS und PC) 	(Suzuki u. a., 2013) (Gyobu u. a., 2017) (Tian u. a., 2012)
Anoctamin-10; TMEM16K	Zellmembran;	<ul style="list-style-type: none"> • Mutation führt zu zerebraler Ataxie 	(Balreira u. a., 2014) (Tian u. a., 2012) (Suzuki u. a., 2013)

1.2.2 ANOCTAMIN-6 – EINE KALZIUMABHÄNGIGE SCRAMBLASE

2015 wurde erstmals die Scrambling-Domäne innerhalb von ANO6 durch Yu et al. identifiziert (Yu u. a., 2015). Im Gegensatz dazu stand ANO1 als klassischer Chloridkanal ohne die Fähigkeit Phospholipide zu transportieren. Die Sequenzhomologie zwischen ANO1 und ANO6 zeigt, dass nur eine Übereinstimmung von rund 37 % zwischen diesen beiden besteht (Anhang Abbildung 25). Im Bereich der nach Yu et al. beschriebenen Scrambling-Domäne, zwischen den Transmembrandomänen 4 und 5, lässt sich erkennen, dass keine bedeutende Übereinstimmung besteht (Abbildung 2) (Yu u. a., 2015). Die Erzeugung von Chimären aus ANO1 und ANO6 durch einen Austausch der Scrambling-Domäne aus ANO6 und dem korrespondierenden Bereich aus ANO1 verlieh der ANO1-6-1-Chimäre die Fähigkeit PS zu externalisieren und hob diese bei ANO6-1-6 auf (Yu u. a., 2015). Hierbei konnte durch mehrere Arbeitsgruppen nachgewiesen werden, dass die PS-Externalisierung durch einen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration induzierbar ist (Abbildung 3) (Nagata u. a., 2016; Schreiber u. a., 2018; Scudieri u. a., 2015).

	TMD 4	TMD 5
	576	626
hANO1	I I I L L D E V Y G C I A R W L T K I E V P K T E K S F E E R L I F K A F L L K F V N S Y T P I F Y V A	
hANO6	I M I L N T I Y E K V A I M I T N F E L P R T Q T D Y E N S L T M K M F L F Q F V N Y Y S S C F Y I A	
	*** * * * * * * * *	
	520	570

Abbildung 2: Lokalisation der Scrambling-Domäne innerhalb von Anoctamin-6. Der ursprünglich als Scrambling-Domäne (grün) beschriebene Bereich von ANO6 befindet sich zwischen der Transmembrandomäne (TMD) 4 und 5. Weitere Untersuchungen zeigten, dass 9 Aminosäuren (*) innerhalb dieses Bereiches essenziell für die Scrambling-Aktivität von ANO6 sind. Innerhalb dieser Domäne weisen die korrespondierenden Aminosäuren (fett) von ANO1 (schwarz) und ANO6 (rot) keine Übereinstimmung auf.

Die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur mit Hilfe des aus dem Pilz *Nectria haematococca* stammenden Anoctamin-Homologes nhTMEM16, ebenfalls eine kalzium-abhängige Scramblase, ermöglichte einen Einblick in den generellen Mechanismus der PS-Externalisierung (Brunner u. a., 2014). Hierbei wurde deutlich, dass ein Homodimer nötig ist um eine Kluft für den Transport der Phospholipide zu bilden (Montigny u. a., 2016). In diesem Modell dienen hydrophile Kopfgruppen als eine Art Sprungstein für den Transport von Phospholipiden und eine Mutation dieser Sprungsteine hatte den Verlust der Scramblase-Aktivität zur Folge (Bethel und Grabe, 2016). Die in der ANO-Familie konservierten Kalziumbindestellen führen zum einen zur Aktivierung der Ionenkanalfunktion und zum anderen sind sie für eine nötige Stabilität der Homodimere verantwortlich (Ishihara u. a., 2016; Nagata u. a., 2016). Eine Analyse der Kluft bzw. Pore bei ANO1 während der aktiven Chloridkanalfunktion deutete ebenfalls daraufhin, dass die gebildete Pore neben den fehlenden hydrophilen Kopfgruppen auch zu klein für einen Transport von Phospholipiden wäre (Paulino u. a., 2017).

Im pathologischen Kontext führt eine ANO6-Defizienz beim Menschen zum Scott-Syndrom. Diese Erkrankung führt phänotypisch zu einer Blutgerinnungsstörung (Zwaal u. a., 2004). Das Scott-Syndrom, benannt nach dem Patienten in dem es ursprünglich entdeckt wurde, weist ein nicht-funktionales ANO6 in Thrombozyten und einer damit einhergehenden gestörten PS-Externalisierung nach Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration auf (Beveris und Williamson, 2016). Ursächlich für den Defekt von ANO6 können verschiedene Mutationen, die u.a. zu einer verkürzten ANO6-Variante führen, sein (Boisseau u. a., 2018; Castoldi u. a., 2011).

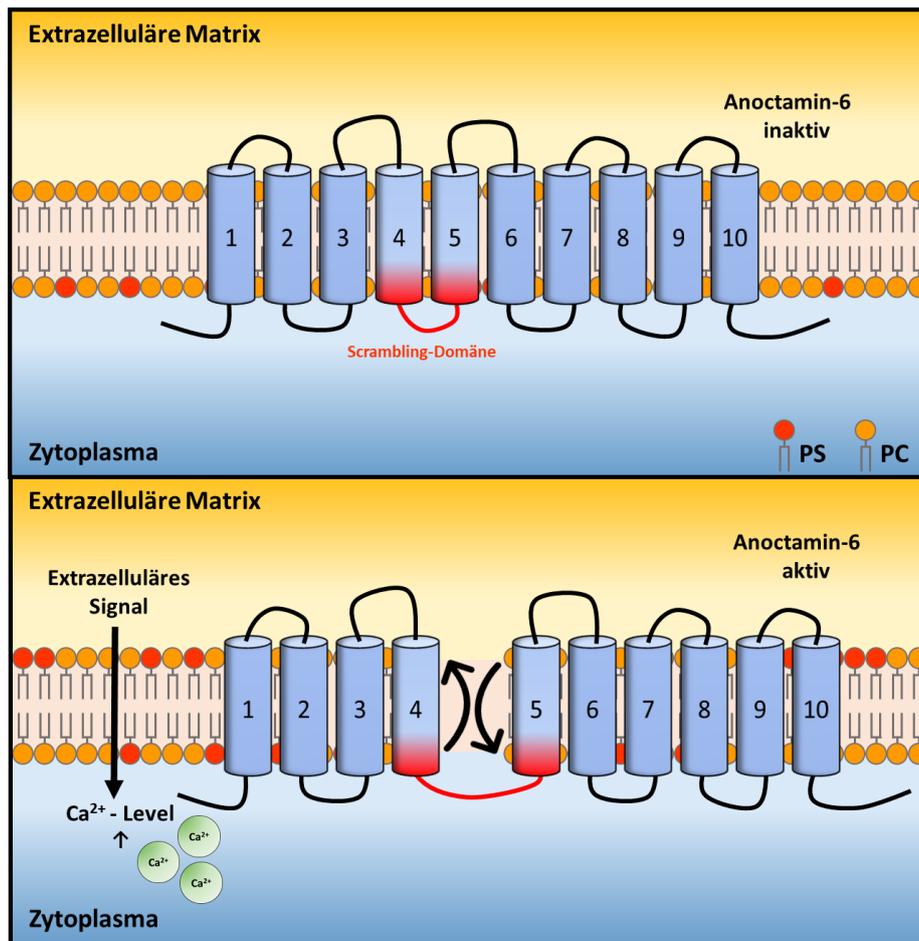


Abbildung 3: Mechanismus der kalziumabhängigen Phosphatidylserin-Exposition durch Anoctamin-6.

Schematische Darstellung der Scramblase-Aktivität des Transmembranproteins ANO6. Die Scrambling-Domäne (rot) befindet sich zwischen TMD 4 und 5. Durch einen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration kommt es zur Aktivierung von ANO6 und einer darauffolgenden PS-Externalisierung (untere Abbildung). Diese erfolgt in Abhängigkeit eines ANO6-Homodimers (nicht dargestellt).

1.3 DISINTEGRIN-ÄHNLICHE METALLOPROTEASEN

Neben den ADAMs, *a disintegrin and metalloproteinases*, bilden ADAMTS, *a disintegrin and metalloproteinases with a thrombospondin motif*, und SVMPs, *snake venom metalloproteinases*, die Untergruppe der Adamalysine und gehören der Klasse der Metzinkine und somit den Zink-Metalloproteasen an (Huxley-Jones u. a., 2007)(Abbildung 4). Der Name ADAM leitet sich dabei von der modularen Struktur der Proteinfamilie ab (Wolfsberg u. a., 1995).

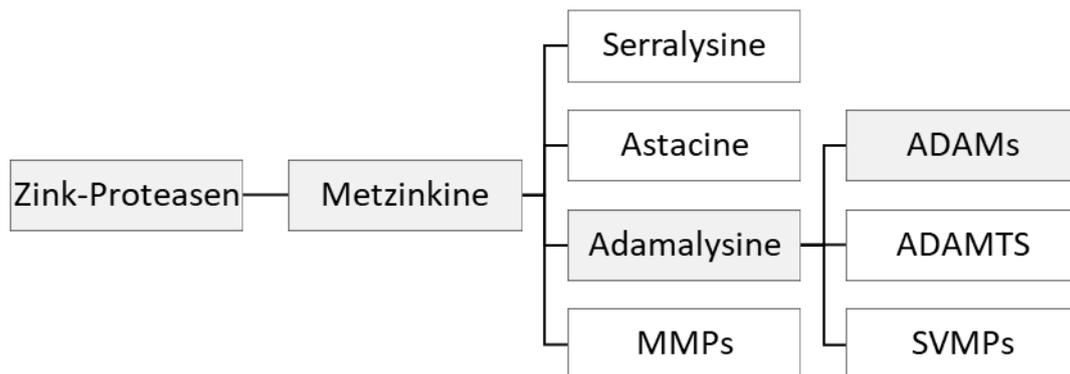


Abbildung 4: Klassifizierung der Zink-Metalloproteasen. Die zinkabhängigen Metalloproteasen der Metzinkine sind die Serralysine, Astacine, Matrix-Metalloproteasen (MMPs) und Adamalysine. Die Adamalysine beinhalten die ADAMs, ADAMTSs und die Schlangengift-Metalloproteasen Klasse III (SVMPs). Adaptiert nach (Huxley-Jones u. a., 2007)

Ursprünglich wurden ADAM1 und ADAM2 durch deren Beteiligung an der Spermatogenese entdeckt. Sie stellen zwei Untereinheiten eines proteolytisch inaktiven Mitglieds der Familie dar (Blobel u. a., 1992; Wolfsberg u. a., 1995). Bis heute sind 40 ADAM-Gene in verschiedenen Säugetierarten beschrieben, wovon im Menschen 20 für ADAM-Mitglieder codieren von denen 12 proteolytisch aktiv sind (ADAM8, 9, 10, 12, 15, 17, 19, 20, 21, 28, 30, 33) (Edwards u. a., 2008; Mochizuki und Okada, 2007). Während die proteolytisch inaktiven Mitglieder mittels ihrer Disintegrin-Domäne für Zell-Zell-Interaktionen verantwortlich sind, katalysieren die proteolytisch Aktiven die Freisetzung von Ektodomänen von Typ-1- und -2-Transmembranproteinen und GPI-verankerten Proteinen (Blobel, 2005; Saftig und Reiss, 2011). Ein Prozess der als Shedding bezeichnet wird und aufgrund seiner irreversiblen Natur eine besondere physiologische Relevanz besitzt.

1.3.1 STRUKTUR VON ADAM17

Die Mitglieder der ADAM-Familie sind Typ-1-Transmembranproteine mit einer für die meisten geltenden „typischen“ Domänenstruktur. Beginnend am N-Terminus setzt sich die Struktur wie folgt zusammen: Pro-, Metalloproteinase-, Disintegrin-, cysteinreiche, EGF-ähnliche, Transmembran- und zytoplasmatische Domäne. Als atypische Mitglieder gelten u.a. ADAM10 und ADAM17 die in ihrer Struktur von dem klassischen Aufbau anderer ADAMs abweichen (Abbildung 5).

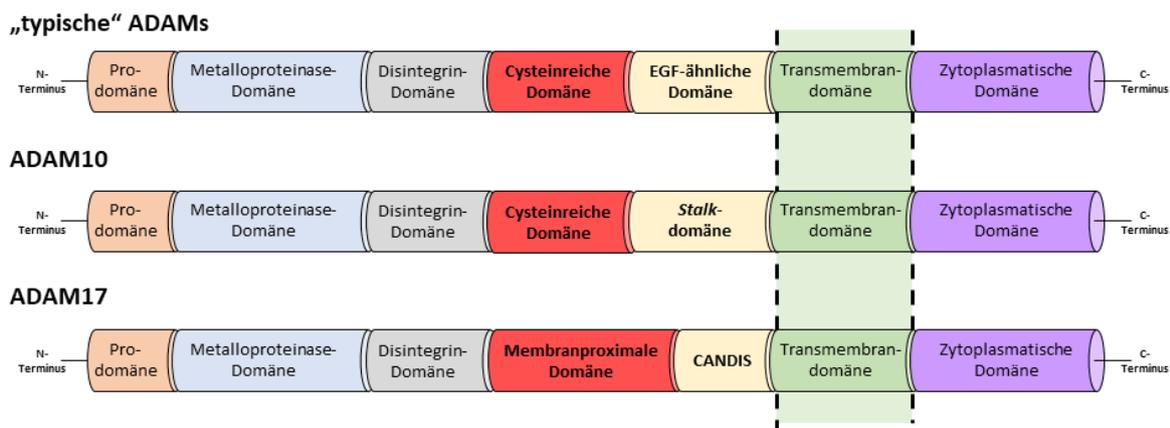


Abbildung 5: Domänenstruktur der ADAMs. Katalytisch aktive ADAMs sind Typ-1-Transmembranproteine und weisen eine weitestgehend konservierte Domänenstruktur auf. N-terminal weisen die Proteine eine Prodomäne, gefolgt von einer Metalloproteinase-, Disintegrin-, cysteinreichen, EGF-ähnlichen, Transmembran- und zytoplasmatischen Domäne auf. ADAM10 unterscheidet sich durch seine *Stalk*-domäne anstelle der EGF-ähnlichen-Domäne. ADAM17 besitzt anstelle der cysteinreichen und EGF-ähnlichen, die membranproximale Domäne und *conserved ADAM-seventeen dynamic interaction sequence* (CANDIS) (Arribas und Esselens, 2009; Moss und Lambert, 2002).

Jede dieser Domänen von ADAM17 erfüllt eine entsprechende Funktion. Die Prodomäne dient als Chaperon und blockiert das katalytische Zentrum bevor sie im trans-Golgi-Apparat durch Proprotein-Konvertasen, wie z.B. Furin, abgespalten wird (Arribas und Esselens, 2009). Die Metalloproteinase-Domäne enthält das katalytische Zentrum mit seinem konservierten Zinkbindenden Motiv (HEXGHXXGXXHD), welches durch die enthaltenen drei Histidine gekennzeichnet ist (Weber und Saftig, 2012). Anschließend daran ist die namensgebende Disintegrin-Domäne vermutlich durch seine Interaktion mit Integrinen an der Substratbindung beteiligt (White, 2003). Abweichend von der „typischen“ ADAM-Struktur folgt für ADAM17 die membranproximale Domäne (MPD). Anhand neuer Erkenntnisse vermittelt diese die Aktivierung und Regulation der Shedding-Aktivität von ADAM17. Hier ist das für die PS-Interaktion notwendige RKGK-Motiv lokalisiert (Sommer u. a., 2016a). Des Weiteren kann durch die Modulation von Disulfidbrücken mittels Protein-Disulfid-Isomerasen die

Konformation der MPD entscheidend beeinflusst und die Shedding-Aktivität *in vitro* reguliert werden (Düsterhöft u. a., 2013; Lorenzen u. a., 2012). Die CANDIS-Region, *conserved ADAM-seventeen dynamic interaction sequence*, ist neben der Substraterkennung auf Grundlage ihrer amphipathischen Struktur an der Interaktion mit der Zellmembran beteiligt (Düsterhöft u. a., 2015). Schlussendlich folgen die Transmembran- und Zytoplasmatische-Domäne, welche vorrangig die Lokalisation von ADAM17 vermitteln (Zunke und Rose-John, 2017). Nachweislich ist die zytoplasmatische Domäne nicht in den Regulationsmechanismus von ADAM17 involviert (Hall und Blobel, 2012; Horiuchi u. a., 2007a; Schwarz u. a., 2013).

Neben ADAM17 zählt auch ADAM10 zu den atypischen ADAMs. Die beiden Proteasen weisen eine strukturelle Ähnlichkeit auf, wobei anstelle der MPD und CANDIS-Region von ADAM17 die cysteinreiche- und *stalk*-Domäne in ADAM10 vorliegt (Abbildung 5). Ebenfalls katalytisch aktiv, prozessiert ADAM10 u.a. Adhäsionsmoleküle oder Wachstumsfaktoren wie Betacellulin und neurales oder epitheliales Cadherin (Maretzky u. a., 2005; Reiss u. a., 2005; Sahin u. a., 2004). Trotz der unterschiedlichen Substratspektren dieser beiden Proteasen wurde bereits berichtet, dass es zu kompensatorischen Effekten zwischen ADAM10 und ADAM17 kommen kann und Substrate durch die jeweils andere Protease gespalten werden (Juanes u. a., 2005; Möller-Hackbarth u. a., 2013; Reddy u. a., 2000). Zu diesen Substraten gehören u.a. der Interleukin-6-Rezeptor (IL-6R), *transforming growth factor alpha* (TGF alpha), *tumor necrosis factor alpha* (TNF alpha) und Fraktalkin bzw. CX3CL1 (Le Gall u. a., 2009; Garbers u. a., 2011; Hundhausen u. a., 2003; Schulte u. a., 2007).

1.3.2 REGULATION DER SHEDDING-AKTIVITÄT VON ADAM17

Die Regulation von ADAM17 ist bis zum heutigen Zeitpunkt nur rudimentär verstanden. Klar ist, dass ADAM17 auf mehreren Ebenen reguliert werden kann. Wie bereits erwähnt ist die Abspaltung der Prodomäne nötig um die katalytische Aktivität von ADAM17 zu ermöglichen (Gonzales u. a., 2004). Weiterführend ist der Transport von ADAM17 vom Golgi-Apparat hin zur Zelloberfläche essenziell für die Funktion als Sheddase. Dieser Transport wird je nach Zelltyp von iRhom1 und iRhom2 vermittelt und eine Defizienz dieser Proteine führt zu einer fehlerhaften Lokalisation von ADAM17 (Lee u. a., 2016; Li u. a., 2015; Matthews u. a., 2016).

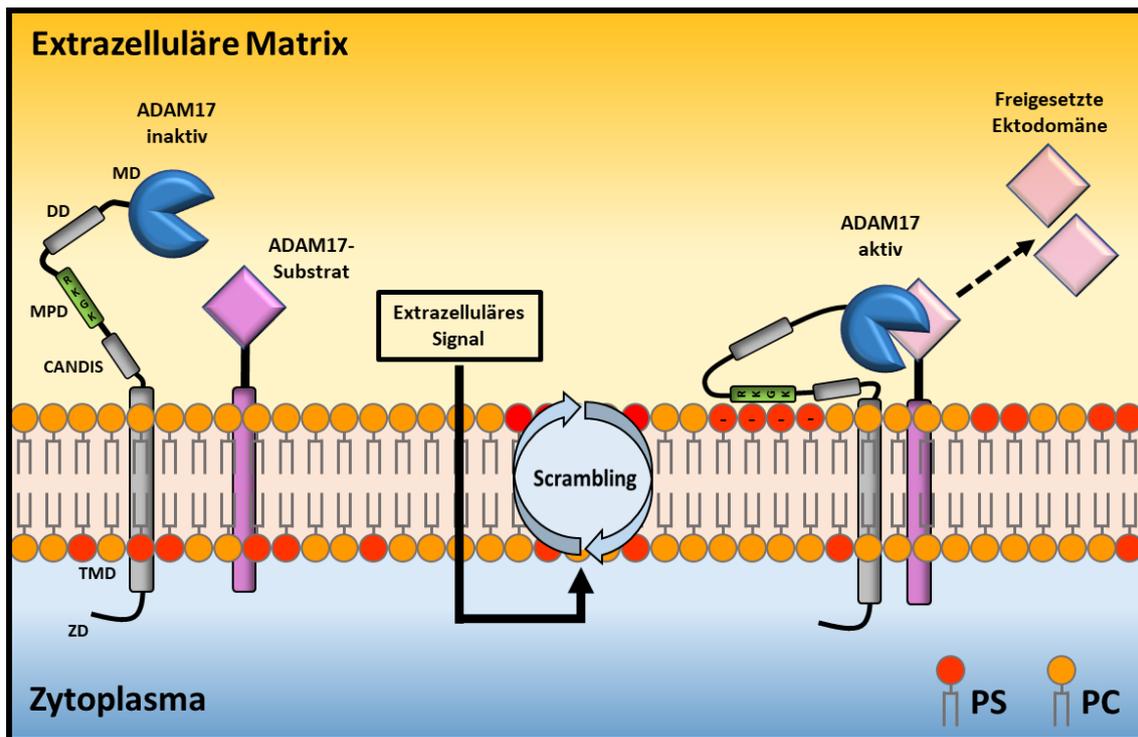


Abbildung 6: Aktivierungsmechanismus des ADAM17-vermittelten Substrat-Sheddings. Neueste Erkenntnisse stellen die Zellmembran in den Fokus des regulatorischen Mechanismus von ADAM17. Durch einen extrazellulären Stimulus kommt es zum Scrambling der Phospholipide innerhalb der Membran. Dadurch wird PS auf der Zellmembranoberfläche exponiert und interagiert mit dem RKGK-Motiv der MPD von ADAM17. Dies wiederum ermöglicht die Shedding-Aktivität von ADAM17 und führt zur Freisetzung von membrangebundenen Substraten. MD- Metalloproteinase-Domäne; DD- Disintegrin-Domäne, ZD-Zytoplasmatische Domäne.

Auf der Zellmembranoberfläche lokalisiert ist sowohl eine direkte als auch eine indirekte Regulation von ADAM17 denkbar. Die für die Freisetzung der Substrat-Ektodomäne notwendige räumliche Nähe zwischen Protease und Substrat legt einen regulatorischen Einfluss einer örtlichen Anreicherung in Nanodomänen, wie *lipid rafts* nahe. Des Weiteren kann eine Mediatorrolle von Proteinen, z.B. iRhoms und Tetraspaninen wie CD9, an der Substraterkennung und einer lokalen Anordnung von Protease und Substrat nicht ausgeschlossen werden (Gutiérrez-López u. a., 2011).

Beim induzierbaren Shedding wurde ursprünglich davon ausgegangen, dass ADAM17 durch eine intrazelluläre Phosphorylierung aktiviert wird. Anhand von ADAM17-Konstrukten mit einer verkürzten oder veränderten zytoplasmatischen Domäne konnte jedoch dieser regulatorische Einfluss widerlegt werden (Hall und Blobel, 2012; Horiuchi u. a., 2007a; Schwarz u. a., 2013). Weiterhin ist bekannt, dass die Aktivierung von Rezeptortyrosinkinasen, wie FGFR2b oder VEGFR2, und G-Protein-gekoppelten Rezeptoren durch z.B. Thrombin die Freisetzung von *epidermal growth factor receptor* (EGFR)-Liganden durch ADAM17 erhöht (Maretzky u. a., 2011; Prenzel u. a., 1999). In Folge der Beobachtung, dass die üblicherweise

verwendeten ADAM-Aktivatoren, z.B. PMA, Melittin und Ionomycin, neben einer ADAM17-Aktivierung auch eine PS-Externalisierung der stimulierten Zellen bewirkten, rückte dadurch ein regulatorischer Einfluss der Zellmembran in den Fokus unserer Arbeitsgruppe (Abbildung 6) (Sommer u. a., 2012). Nachfolgende Untersuchungen führten zur Identifikation eines polykationischen PS-bindenden Motivs innerhalb der MPD von ADAM17 (R625, K626, K628) (Sommer et al., 2016). Eine Mutation dieses RKxK-Motivs und einer damit einhergehenden fehlenden Interaktion mit PS führte zum vollständigen Verlust der Sheddase-Funktion. Der zugrunde liegende Mechanismus der PS-Externalisierung bleibt weiterhin unklar und wirft die Frage auf, wie die Aktivierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR), Kalziuminflux oder einer Aktivierung der Proteinkinase C in diesen Prozess involviert ist.

1.3.3 ADAM17 IM PHYSIOLOGISCHEN UND PATHOPHYSIOLOGISCHEN KONTEXT

Im Gegensatz zur Regulation von ADAM17 ist der Einfluss im physiologischen Rahmen deutlich aufgeklärter. Ursprünglich als TNF-alpha *converting enzyme* (TACE) identifiziert, sind heute bereits etwa 80 ADAM17-Substrate bekannt (Kozlosky u. a., 1997; Zunke und Rose-John, 2017). Deren Spannweite umfasst neben Wachstumsfaktoren auch Adhäsionsmoleküle, Rezeptoren und Zytokine. Hierbei wird deutlich, dass ADAM17 maßgeblich an der Freisetzung von EGFR-Liganden beteiligt ist. Tabelle 3 enthält einige ausgewählte Substrate und deren Funktion.

Tabelle 3: Ausgewählte ADAM-Substrate und deren Bedeutung

Substrat	Beteiligte ADAMs	Funktion	Referenz
Wachstumsfaktoren			
Pro-AREG	ADAM17	Migration, Proliferation	(Berasain und Avila, 2014) (Sahin u. a., 2004)
Pro-TGF-alpha	ADAM17 ADAM10	Angiogenese, Proliferation,	(Arribas u. a., 1996) (Mead und Fausto, 1989) (Le Gall u. a., 2009)
Pro-HB-EGF	ADAM17	Wundheilung, Migration	(Sahin u. a., 2004) (Raab und Klagsbrun, 1997)
Zytokine			
Pro-TNF-alpha	ADAM17	Inflammation, Apoptose	(Bell u. a., 2007) (Rath und Aggarwal, 1999)

Adhäsionsmoleküle			
JAM-A	ADAM17	Transmigration	(Wojcikiewicz u. a., 2009) (Laukoetter u. a., 2007)
L-Selektin	ADAM17	Adhäsion	(Arribas u. a., 1996) (McEver u. a., 1995)
VCAM-1	ADAM17	Adhäsion, Atherosklerose	(Cybulsky u. a., 2001) (Garton u. a., 2003)
Rezeptoren			
IL-6R	ADAM17	Pro- und Anti-Inflammation	(Arribas u. a., 1996) (Rose-John, 2012)
TNFR1/TNFR2	ADAM17	Apoptose	(Bell u. a., 2007) (Locksley u. a., 2001)

* Amphiregulin (AREG); *transforming growth factor* (TGF); *heparin binding-EGF*(HB-EGF); *tumor necrosis factor* (TNF); *junctional adhesion molecule A*(JAM-A); vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1); Interleukin (IL)

Die essenzielle Bedeutung der Sheddase-Funktion von ADAM17 wird besonders im Rahmen des Entwicklungsprozesses von Maus und Mensch deutlich. Bis heute wurde bei drei Patienten eine ADAM17-Defizienz festgestellt (Blaydon u. a., 2011; Tsukerman u. a., 2015). Diese wiesen vermutlich aufgrund einer verminderten EGFR-Liganden-Freisetzung eine erhebliche Störung der Haut- und Epithelregeneration auf und neigten verstärkt zu bakteriellen Infektionen, welche durch den Verlust des Schutzes der Haut und des Epithels begünstigt wurden. Des Weiteren weisen die Patienten eine geringe Lebenserwartung auf. Drastischer fällt der Phänotyp in ADAM17-defizienten Mausmodellen aus. Ein den gesamten Organismus betreffender ADAM17-*Knock-Out* führt in verschiedenen Modellen zu einer pränatalen Letalität (Canault u. a., 2010; Peschon u. a., 1998; Sommer u. a., 2016a) (Tabelle 4). Dieser, wenn auch drastischer ausfallende, Phänotyp ähnelt grundsätzlich dem eines TGF-alpha-defizienten Mausmodells in Hinsicht auf Haar- und Hautdefekte (Luetkeke u. a., 1993; Mann u. a., 1993). Die Freisetzung von Wachstumsfaktoren wie z.B. AREG oder TGF-alpha, welche wiederum als membrangebundene Proform exprimiert werden, ist u.a. während der Entwicklung essenziell für eine normale Angiogenese und Proliferation von Keratinozyten (Canault u. a., 2010). In einem hypomorphen ADAM17-Mausmodell sind die entsprechenden Tiere zwar lebensfähig, dennoch weisen sie eine signifikant geringere Freisetzung von verschiedenen Substraten wie z.B. TNFR und L-Selektin auf. Des Weiteren zeigen sie eine gestörte intestinale Regeneration und neigen daher zu einer verstärkten Inflammation in diesem Bereich (Scheller u. a., 2011).

Tabelle 4: Ausgewählte ADAM17-defiziente Mausmodelle

Mutationsstrategie	Phänotyp	Referenz
ADAM17 ^{ΔZn/ΔZn}	Pränatale Letalität (wenige Überlebende mit geringer Lebenszeit), Haardefekte, epitheliale Störungen, Defekt des pränatalen Augenlidschlusses, Störungen der Gefäßbildung	(Peschon u. a., 1998) (Gelling u. a., 2008) (Canault u. a., 2010)
ADAM17 ^{-/-} (<i>loxP-Elia-Cre-System</i>)	Pränatale Letalität (wenige Überlebende mit geringer Lebenszeit), epitheliale Störungen, Defekt des pränatalen Augenlidschlusses	(Horiuchi u. a., 2007b)
ADAM17 ^{ex/ex}	Überlebensfähig, epitheliale Störungen, Haardefekte, Defekt des pränatalen Augenlidschlusses, Störung der Milchdrüsenbildung	(Chalaris u. a., 2010) (Nicolaou u. a., 2017)

Im Kontrast zu seiner essenziellen Funktion innerhalb einer normalen Entwicklung steht die Dysregulation von ADAM17 im pathophysiologischen Kontext. Neben einer anti-inflammatorischen Wirkung des IL-6-Rezeptors durch dessen klassische Signaltransduktion kann auch eine proinflammatorische Wirkung durch die Freisetzung des Rezeptors mittels ADAM17 auftreten. Hierbei bindet der freigesetzte IL-6R lösliches IL-6 und verhindert so dessen anti-inflammatorische Wirkung (Rose-John, 2012).

Des Weiteren ist eine verstärkte Expression von ADAM17 mit der Progression verschiedener Krebsarten, u.a. Kolon-, Brust- und Prostatakrebs assoziiert (Blanchot-Jossic u. a., 2005; Karan u. a., 2003; Lendeckel u. a., 2005). Ein Zusammenhang wird hierbei zwischen der vermehrten Freisetzung von EGFR-Liganden und deren Einfluss auf die Tumorpheriferation untersucht (Fischer u. a., 2003; Schmidt u. a., 2018). Mögliche Therapieansätze innerhalb dieser sehr unterschiedlichen Krankheitsbilder benötigen jedoch ein vollständiges Verständnis des Aktivierungsmechanismus von ADAM17.

2 ZIELSETZUNG

ADAM17 ist durch die Freisetzung verschiedenster Transmembranproteine an grundlegenden Prozessen in der Entwicklung, während der Zellproliferation und an der Signaltransduktion beteiligt. Eine Defizienz führt im Mausmodell zu einer pränatalen Letalität und beim Menschen zu einem vielschichtigen Krankheitsbild mit einem frühzeitigen Tod der Patienten. Des Weiteren ist eine Dysregulation der ADAM17-Aktivität mit verschiedensten Krebserkrankungen, u.a. mit Darmkrebs, assoziiert.

Trotz dieser weitreichenden Funktionen ist der Aktivierungsmechanismus von ADAM17 bis heute nur lückenhaft verstanden. Der Einfluss verschiedenster Faktoren auf die Aktivierung von ADAM17, u.a. G-Protein-gekoppelter Rezeptoren, Proteinkinasen und ein Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration wurden vielfach untersucht, doch sind viele Schlüsselstellen weiterhin unklar. Eine neue Hypothese stellt die Zellmembran in den Mittelpunkt dieses Aktivierungsprozesses und greift auf vielversprechende in vitro-Daten zurück. Danach kommt es durch eine temporäre Auflösung der Zellmembran-Asymmetrie und einer damit verbundenen Exposition von Phosphatidylserin auf der extrazellulären Seite der Zellmembran zu einer Interaktion mit dem polykationischen Motiv der MPD von ADAM17 und somit zu dessen Aktivierung.

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die Scramblase Anoctamin-6 ein entscheidender Mediator der Phosphatidylserin-Externalisierung und somit ein Bindeglied zwischen verschiedenen Stimulationswegen und der Aktivierung von ADAM17 ist. Des Weiteren sollte auf Grundlage der bekannten in vitro-Daten zur Interaktion von Phosphatidylserin mit dem RKGK-Motiv von ADAM17 anhand eines in vivo-Modells dessen Relevanz in einem komplexen System analysiert werden.

Das Ziel dieser Arbeit war es, den Aktivierungsmechanismus von ADAM17 besser zu verstehen und anhand dieser Erkenntnisse möglicherweise genauere Wege der Regulation dieser Protease zu ermöglichen.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 MATERIALEN

Tabelle 5: Verbrauchsmaterialien

μ-slide 8-Well	ibidi, DE
μ-slide Rack	ibidi, DE
Drigalski-Spatel, Delta™ Disposable Cell Spreader	Heathrow Scientific, US
Einfrierbehälter, Nalgene Mr. Frosty	Thermo Fisher Scientific, US
Frischhaltebox, luftdicht	EMSA, DE
Gene Pulser Cuvette	Bio-Rad Laboratories, DE
Lumox® Zellkulturplatten (96-Well)	Sarstedt, DE
Mikro-Schraubröhre (2 ml)	Sarstedt, DE
Mikrotiterplatten, flacher Boden, ELISA (96-Well)	Greiner Bio One, DE
Pasteurpipetten	Carl Roth, DE
PCR-Reaktionsgefäß Multiply®-μStrip (200 μl)	Sarstedt, DE
Petrischalen	Sarstedt, DE
Pipettenspitzen (20 μl, 200 μl, 1000 μl)	Sarstedt, DE
Pipettenspitzen mit Filter (20 μl, 200 μl, 1000 μl)	Sarstedt, DE
Präparationsbesteck	Fine Scientific Tools, DE
Reaktionsgefäß DNA LoBind (1,5 ml)	Eppendorf, DE
Reaktionsgefäße (2 ml, 1,5 ml)	Sarstedt, DE
Roti®-PVDF-Membran (0,45 μm)	Carl Roth, DE
Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt, DE
Sterican® Einmal-Injektions-Kanüle (Größe 18)	B.Braun, DE
Whatman®-Filterpapier (1,5 mm)	Carl Roth, DE
Zellkulturplatten (6-, 12-, 24-, 96-Well)	Sarstedt, DE
Zellkulturschalen (10 cm)	Sarstedt, DE
Zellschaber (16 cm, 25 cm)	Sarstedt, DE
Zellzählkammern, SD100	Nexcelom Bioscience, US
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Sarstedt, DE

3.2 CHEMIKALIEN

Tabelle 6: Chemikalien

1,10-Phenanthrolin	Carl Roth, DE
2-Mercaptoethanol	Carl Roth, DE
<i>4-(2-Aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride hydrochloride (AEBSF)</i>	Sigma-Aldrich, US
ADAM-Substrat, fluorogen	Enzo, US
Adenosintriphosphat (ATP)	Sigma-Aldrich, US
Agar-Agar	Carl Roth, DE
Agarose	Carl Roth, DE
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth, DE
Ampicillin	Carl Roth, DE
Annexin V – Alexa Fluor™ 568	Thermo Fisher Scientific, US
<i>Biofreeze Einfriermedium</i>	Biochrom, DE
<i>Bovine serum albumin (BSA)</i>	Sigma-Aldrich, US
Bromphenolblau	Carl Roth, DE
BSA-Standard	Fermentas, DE
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Carl Roth, DE
cOmplete™, Protease-Inhibitor-Mix	Roche, CH
Desoxynukleotide (dNTPs)	Fermentas, DE
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth, DE
Di-Natriumhydrogenphosphat	Carl Roth, DE
<i>DirectPCR® Lysis Reagent Tail</i>	PEQLAB Biotechnologie, DE
Dithiothreitol (DTT)	Fermentas, DE
DNA-Ladepuffer, 6x Loading Dye	Fermentas, DE
DNA-Marker, <i>Generuler™ 1 kb DNA ladder</i>	Fermentas, DE
DNA-Marker, <i>Generuler™ 100 bp DNA ladder</i>	Fermentas, DE
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) High Glucose (4,5 g/l)</i>	Thermo Fisher Scientific, US
ECL™ Select Western Blotting Detection Reagenzien	GE Healthcare, US
Essigsäure	Carl Roth, DE

Ethidiumbromid	Carl Roth, DE
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth, DE
Fetales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories, US
Gelatine	Serva Feinbiochemica, DE
GI254023X (GI)	Tocris Bioscience, UK
Gibco™ Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)	Thermo Fisher Scientific, US
Gibco™ Sterile Distilled Water	Thermo Fisher Scientific, US
Glukose	Carl Roth, DE
Glycerin	Carl Roth, DE
GW280264X (GW)	AOBIOUS, USA
Hefeextrakt	Carl Roth, DE
HEPES	Carl Roth, DE
Hoechst 33342	Thermo Fisher Scientific, US
Ionomycin (IO), freie Säure	Merck Millipore, DE
Isopropanol	Carl Roth, DE
Kaliumchlorid (KCl)	Merck Millipore, DE
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth, DE
Kollagen aus Rattenschwanz	Roche, CH
Laktadherin, bovine	Haematologic Technologies, UK
Magnesiumchlorid (MgCl₂)	Merck Millipore, DE
Magnesiumhydroxid (Mg(OH)₂)	Merck Millipore, DE
Magnesiumsulfat (MgSO₄)	Merck Millipore, DE
Marimastat (MM)	Tocris Bioscience, UK
Melittin (Mel)	Hergestellt von J. Andrä (FZ Borstel)
Methanol	Carl Roth, DE
Milchpulver	Carl Roth, DE
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, DE
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth, DE
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth, DE

O-Phospho-L-Serin (OPS)	Sigma-Aldrich, US
Paraformaldehyd (PFA)	Merck Millipore, DE
Penicillin/Streptomycin (P/S), 100x	PAA Laboratories, US
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	Sigma Aldrich, US
Phosphatase-Substrat	Sigma-Aldrich, US
PhosSTOP™, Phosphatase-Inhibitor-Mix	Roche, CH
Pierce™ 660nm-Reagenz	Thermo Fisher Scientific, US
Proteinmarker, <i>Prestained Protein Marker</i>	New England Biolabs, US
Rotiphorese Gel 30 % (Acrylamid/Bisacrylamid 37, 5:1)	Carl Roth, DE
Saccharose	Carl Roth, DE
Salzsäure, rauchend (HCl)	Carl Roth, DE
Schwefelsäure, 2 N	Carl Roth, DE
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth, DE
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Carl Roth, DE
Triton X-100	Carl Roth, DE
Trpyton/Pepton aus Casein	Carl Roth, DE
Trypanblau	Sigma-Aldrich, US
Trypsin-EDTA, 10x	PAA Laboratories, US
Turbofect	Thermo Fisher Scientific, US
Tween20	Carl Roth, DE

3.3 ENZYME

Tabelle 7: Enzyme

<i>PpuMI</i>	New England Biolabs, US
Proteinase K	Analytik Jena, DE
<i>Taq</i> DNA Polymerase	New England Biolabs, US

3.4 KITS

Tabelle 8: Kits

Amphiregulin-ELISA DuoSet (Maus)	R & D Systems, US
IL-6 Rα-ELISA DuoSet (Maus)	R & D Systems, US
<i>Pierce Cell Surface Protein Isolation Kit</i>	Thermo Fisher Scientific, US
Pure Yield™ <i>plasmid Midiprep kit</i>	Promega Corporation, US
QuikChange® II <i>Site-directed Mutagenesis XL</i>	Agilent, US
TNF RI/TNFRSF1A-ELISA DuoSet (Maus)	R & D Systems, US

3.5 GERÄTE

Tabelle 9: Geräte

-80 °C Gefrierschrank Forma 900	Thermo Fisher Scientific, US
Absaug-Pumpe, <i>BVC professional</i>	Vacuubrand, DE
Analysenwaage S-603	Denver Instruments, US
Analysenwaage XS205	Mettler Toledo, US
Brutschrank HERA cell 150	Thermo Fisher Scientific, US
Einkanalpipetten	Brand, DE
Einkanalpipetten	Abimed, DE
Elektroporator, <i>Micropulser</i>	Bio-Rad Laboratories, DE
Fotokamera, EOS 1100D	Canon, JP
Gerrix® 1000	Biostep, DE
Heizblock, <i>Thermomixer comfort</i>	Eppendorf, DE
Infinite® M Plex	Tecan Trading, CH
Lichtmikroskop, invers	Helmut Hund, DE
Magnetrührer CB162	Bibby Scientific, UK
Mehrkanalpipette	Abimed, DE
Olympus FV1000, konfokales Fluoreszenzmikroskop	Olympus, JP
Mikrowelle	Samsung, KR
<i>Multi-Imagingsystem Fusion FX7</i>	PEQLAB Biotechnologie, DE
<i>PCR UV Workstation</i>	Analytik Jena, DE
PerfectBlue™ Doppelgelsystem Twin S	PEQLAB Biotechnologie, DE

PerfectBlue™ Semi-dry ElectroBlotter	PEQLAB Biotechnologie, DE
PerfectBlue™ Tank-Elektroblotter Web S	PEQLAB Biotechnologie, DE
pH-Meter ph211	Hanna Instruments, IT
Rollentisch, RS-TR10	Phoenix Instruments, DE
Sonifizierer	Bandelin electronic, DE
Spannungsgeber EV231	PEQLAB Biotechnologie, DE
Spannungsgeber, PAC 300	Bio-Rad Laboratories, DE
Spektrophotometer, Nanodrop 1000	PEQLAB Biotechnologie, DE
Sterilwerkbank	Köttermann, DE
Thermocycler, Peqstar 96 Universal Gradient	PEQLAB Biotechnologie, DE
Überkopfschüttler, MACX Mix	Miltenyi Biotec, DE
Vortexer, Vortex Genie	IKA, DE
Wärmeschrank	Memmert, DE
Wasseraufbereitungssystem TKA GenPure	TKA, DE
Wasserbad GFL1004	GFL, DE
Wiloskop F	Helmut Hund, DE
Zellzählgerät, Cellometer® Auto 1000	Nexcelom Bioscience, US
Zentrifuge 5417R, Festwinkelrotor F45-30-11	Eppendorf, DE
Zentrifuge 5424, Festwinkelrotor F45-24-11	Eppendorf, DE
Zentrifuge 5810R, Ausschwingrotor A-4-62	Eppendorf, DE
Zentrifuge, Haraeus Multifuge X3R	Thermo Fisher Scientific, US

3.6 ANTIKÖRPER

3.6.1 PRIMÄRE ANTIKÖRPER

Tabelle 10: Primäre Antikörper

Antigen/Bezeichnung	Firma	Immunierte Spezies	Verdünnung WB
Actin, I-19	Santa Cruz Biotechnology	Ziege	1:1000
ADAM10, AB19026	Merck Millipore	Kaninchen	1:1000
ADAM17, AB19207	Merck Millipore	Kaninchen	1:1000
ADAM17, ab57484	Abcam	Maus	1:1000

ADAM17, D1(A12)	AdipoGen	Rekombinantes Protein aus E.coli	200 nM
AKT, C67E7	Cell Signaling Technology	Kaninchen	1:1000
ANO6, PA5-35240	Thermo Fisher Scientific	Kaninchen	1:1000
Furin, H-220	Santa Cruz Biotechnology	Kaninchen	1:1000
GAPDH, FL-335	Santa Cruz Biotechnology	Kaninchen	1:500
GFP, 7.1 und 13.1	Roche	Maus	1:2000
β-Tubulin, E7	DSHB	Maus	1:250

3.6.2 SEKUNDÄRE ANTIKÖRPER

Tabelle 11: Sekundäre Antikörper

Antigen/Bezeichnung	Firma	Immunisierte Spezies	Gekoppelt mit	Verdünnung WB
Anti-Kaninchen	Jackson Immunoresearch	Ziege	<i>Horseradish peroxidase</i>	1:10.000
Anti-Maus	Jackson Immunoresearch	Schaf	<i>Horseradish peroxidase</i>	1:10.000
Anti-Ziege	Jackson Immunoresearch	Esel	<i>Horseradish peroxidase</i>	1:10.000

3.7 PLASMIDE

Tabelle 12: Plasmide

Name	Vektor	Herkunft
Anoctamin-6 ΔSD	pcDNA3.1 (Invitrogen)	K. Kunzelmann (UR, Regensburg, DE)
Anoctamin-6-GFP	pcDNA3.1 (Invitrogen)	K. Kunzelmann (UR, Regensburg, DE)
AREG-AP	pAPtag5 (GenHunter)	C. Blobel (HSS, New York, US)
GFP	pcDNA3.1 (Invitrogen)	K. Kunzelmann (UR, Regensburg, DE)
P2X7-Rezeptor	pcDNA3.1 (Invitrogen)	C. Blobel (HSS, New York, US)
TGFα-AP	pAPtag5 (GenHunter)	C. Blobel (HSS, New York, US)

3.8 SOFTWARE

Tabelle 13: Software

Microsoft Office 365 ProPlus	Microsoft, US
ImageJ 1.51j8	National Institutes of Health, US
Genome Compiler (Version 2.2.88)	Twist Bioscience; US
Adobe Photoshop CS4 (Version 11.0)	Adobe Systems, US
Mendeley Desktop (Version 1.19.2)	Mendeley, UK
Olympus Fluoview 10 (Version 4.2)	Olympus, JP
GraphPad Prism 7 (Version 7.02)	GraphPad Software, US

3.9 ADAM17-3X-MAUSMODELL

Zur Untersuchung der in vivo Relevanz der Membranasymmetrie auf die ADAM17-Aktivierung war die Generierung eines neuen Modellsystems nötig. Dieses wurde durch die Firma Taconic Biosciences (DE) generiert (Projekt UKSH0010). In diesem Mausmodell wurde mit Hilfe des CRISPR/Cas9-Systems das polykationische RKGK-Motiv der MPD von ADAM17 zu einem neutralen GGGG-Motiv modifiziert (Abbildung 7). Des Weiteren wurde durch diese konstitutive *Knock-In*-Mutation eine stille Mutation innerhalb des Exons 15 eingebracht. Diese erzeugte eine neue Schnittstelle für das Restriktionsenzym *PpuMI*, welches zur Genotypisierung der Tiere genutzt werden kann. Den genetischen Hintergrund dieses Modells bilden C57BL/6NTac-Mäuse, deren Haltung in individuell ventilierten Käfigen (IVC) erfolgte und durch die Zentrale Tierhaltung des UKSH durchgeführt wurde.

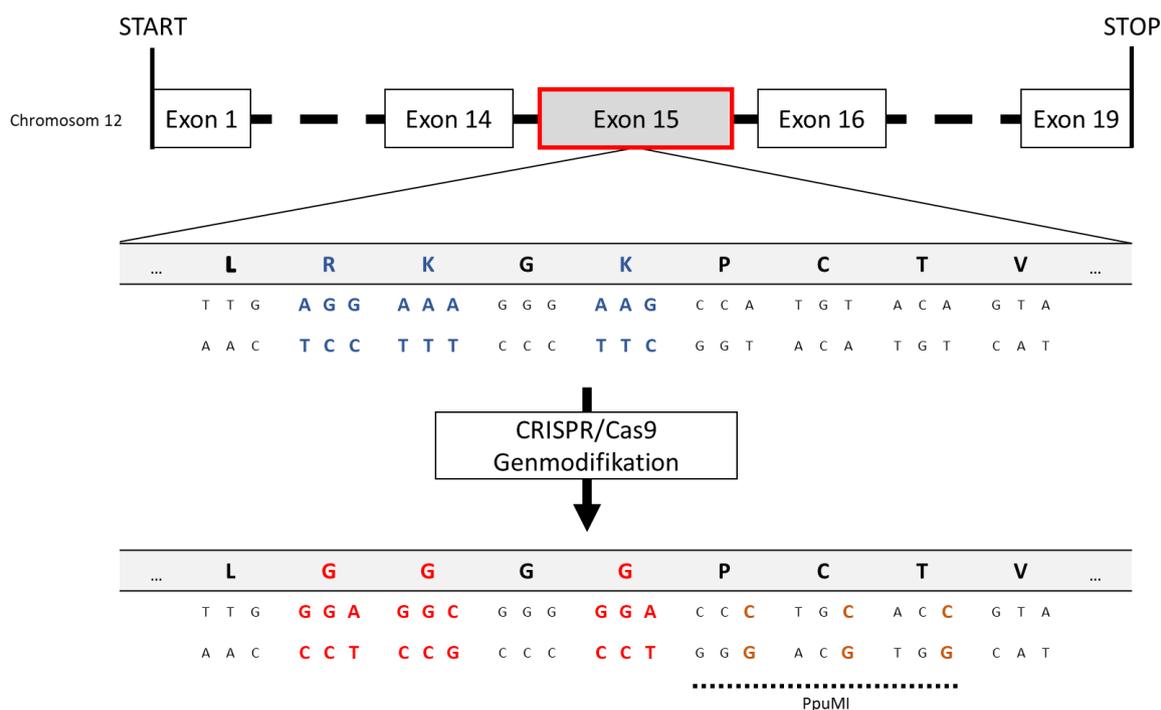


Abbildung 7: Mutationsstrategie zur Erzeugung des ADAM17-3x Mausmodells. Die codierende DNA-Sequenz für das RKGK-Motiv (blau) der MPD von ADAM17 befindet sich auf dem Chromosom 12 innerhalb des Exons 15 von C57BL/6NTac-Mäusen. Mit Hilfe des CRISPR/Cas9-Systems erzeugt eine Knock-In-Mutation ein neutral-geladenes GGGG-Motiv (rot) und eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *PpuMI* mittels einer stillen Mutation (braun).

3.9.1 GENOTYPISIERUNG VON MÄUSEN UND MÄUSEMBRYONEN

Für die Genotypisierung der ADAM17-3x-Mäuse wurde genomische DNA aus Schwanzspitzen, Ohrlochstanzen oder embryonalem Material mit Hilfe des DirectPCR® *Lysis Reagent* unter Zugabe von Proteinase K entsprechend der Herstellerangaben gewonnen. Nach einer Hitzeinaktivierung der Proteinase K bei 85 °C für 45 min wurde jeweils 1 µl der Lösung in einen PCR-Ansatz überführt.

	Primer 1 (Sigma-Aldrich, US):	0,2 µl
	5'-TCTGGGAGTAAGGCCAAAGAC-3'	
	Primer 2 (Sigma-Aldrich, US):	0,2 µl
	5'-TGAGCTCAAAGACAGCAGACC-3'	
1x PCR-Ansatz	10x <i>Standard Taq Buffer</i>	5,0 µl
	<i>Taq</i> DNA-Polymerase	0,5 µl
	2 mM dNTP-Mix	5,0 µl
	DMSO	2,0 µl
	H ₂ O	36,1 µl

Die PCR erfolgte in einem Peqstar 96 *Universal Gradient* Thermocycler unter folgenden Bedingungen:

Initiale Erwärmung		5 min	95 °C
37 Zyklen	Denaturierung	30 sek	95 °C
	Primerhybridisierung	30 sek	60 °C
	DNA-Amplifikation	1 min	72 °C
Terminale Abkühlung		10 min	72 °C

Nach der Amplifikation des PCR-Produktes wurden jeweils 10 µl entnommen, mit 1 µl *PpuMI* versetzt und es erfolgte ein Restriktionsverdau bei 37 °C für 48 h. Anschließend wurden die Proben auf einem Agarose-Gel aufgetragen, mittels Gelelektrophorese entsprechend ihrer Größe aufgetrennt und analysiert (Kapitel 3.15.4).

3.9.2 PRÄPARATION VON PRIMÄREN HEPATOZYTEN

Die primären murinen embryonalen Hepatozyten (MEH) der ADAM17-3x-Mäuse wurden am Embryonaltag 14 (E14) aus entsprechenden Embryonen isoliert. Hierzu wurde der Embryo innerhalb seiner Fruchtblase aus dem Muttertier entfernt und in sterilem PBS gewaschen. Anschließend wurde dieser durch Dekapitation getötet und ventral geöffnet. Die Leber wurde vom restlichen embryonalen Material separiert und in frischem PBS gewaschen. Danach erfolgte die Vereinzelung der Leberzellen durch Auf- und Abpipettieren in 200 µl DMEM, versetzt mit 10 % fetalem Kälberserum (FCS) und 1 % Penicillin/Streptomycin-Mix (P/S) (DMEM^{+/+}). Daraufhin wurden die Zellen auf Zellkulturschalen mit einer Kollagenbeschichtung transferiert und in DMEM^{+/+} kultiviert. Nach 12 h erfolgte ein Wechsel des Mediums um Zellschrott und nicht adhärenente Zellen zu entfernen. Weitere Untersuchungen der Hepatozyten wurden 72 h nach Kultivierungsbeginn durchgeführt.

3.9.3 PRÄPARATION VON PRIMÄREN FIBROBLASTEN

Die Isolation von primären murinen embryonalen Fibroblasten (MEF) erfolgte aus Embryonen am E14 (Kapitel 3.9.2). Nach deren initialem Waschen in PBS wurde das mesenchymale Stützgewebe des Embryos separiert und das restliche Gewebe entfernt. Anschließend wurde

dieses mesenchymale Gewebe in frischem PBS gewaschen, auf eine Zellkulturschale überführt und mit Hilfe eines Skalpell in kleine Stücke zerteilt. Die weitere Vereinzelnung und Kultivierung der Zellen erfolgte in DMEM^{+/+}. Entsprechend der MEH wurde auch hier nach 12 h der Zellschrott durch einen Mediumwechsel entfernt und die weitere Analyse der Zellen erfolgte nach 72 h.

3.10 ZELLINIEN

HEK293T (*human embryonic kidney*) ist eine adhärenz Zelle, die ursprünglich aus embryonalen Nierenzellen generiert wurde. Im Gegensatz zu HEK293 wurde diese Linie mit dem Simian-Virus 40 transformiert.

MEH (*murine embryonale Hepatozyten*) sind primäre adhärenz Zellen, die eigenständig für diese Arbeit aus der Leber von ADAM17-3x-Mäusen präpariert wurden (Kapitel 3.9.2). Es handelt sich hierbei um eine kurzzeitig kultivierte Zelllinie zur Untersuchung der in vivo Relevanz des RKGK-Motivs innerhalb der MPD von ADAM17.

MEF (*murine embryonale Fibroblasten*) sind wie MEH primäre adhärenz Zellen, die aus ADAM17-3x-Mäusen präpariert wurden (Kapitel 3.9.3). Sie dienen ebenfalls der Untersuchung der in vivo Relevanz des RKGK-Motivs innerhalb der MPD von ADAM17.

3.11 KULTIVIERUNG VON ZELLEN

Die Kultivierung aller Zelllinien erfolgte in einem Brutschrank bei einer Umgebungstemperatur von 37 °C, einem CO₂-Gehalt von 5 % und einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre. Alle verwendeten Lösungen und Materialien waren steril und sämtliche Arbeiten erfolgten innerhalb einer Sicherheitswerkbank mit laminarem Luftstrom. Die für die Kultivierung und das Passagieren der Zellen verwendeten Lösungen wurden vor Beginn der Arbeiten in einem Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Alle Zelllinien wurden mit DMEM^{+/+} kultiviert.

	DMEM <i>High Glucose</i>	89 % (v/v)
Zellkulturmedium (DMEM^{+/+})	FCS	10 % (v/v)
	P/S	1 % (v/v)

Sowohl die MEH als auch die MEF wurden lediglich für einen Zeitraum von 72 h kultiviert. Sie wurden nicht passagiert, um den äußeren Einfluss und dessen mögliche Auswirkung auf Morphologie oder Funktionalität dieser primären Zellen so gering wie möglich zu halten.

HEK293T-Zellen wurden bei einer Konfluenz von 80-90 %, welche durch regelmäßige Kontrolle mittels eines Lichtmikroskops überprüft wurde, passagiert. Hierzu wurde das verbrauchte Kulturmedium der Zellen abgesaugt und anschließend erfolgte ein Waschschrift mit 10 ml PBS. Nach dem Waschen wurde das PBS entfernt und die Zellen mit 2,5 ml Trypsin-EDTA bei 37 °C für 1 min inkubiert. Trypsin bewirkt durch seine proteolytische Aktivität das Ablösen der Zellen vom Boden der Zellkulturschale. Nach der Inkubation erfolgte ein Abstoppen der Proteolyse durch Zugabe von 7,5 ml DMEM^{+/+}. Mit Hilfe des zugegebenen Kulturmediums wurden die Zellen durch sanftes Auf- und Abpipettieren innerhalb einer serologischen Pipette vereinzelt. Anschließend wurde nach Bedarf ein Teil der Zellsuspension auf eine neue Zellkulturschale oder eine definierte Zellzahl auf Zellkulturplatten überführt.

3.11.1 BESCHICHTUNG VON ZELLKULTURMATERIALIEN

Um die Kultivierung bzw. das Anwachsen von HEK293T-Zellen auf Zellkulturschalen und -platten zu erleichtern, wurden diese mit 0,25 % (w/v) Gelatine-Lösung beschichtet. Das Zellkulturmaterial wurde je nach Größe der Wachstumsfläche mit einer entsprechenden Menge an Gelatine-Lösung bedeckt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte ein einmaliges Waschen mit PBS um die restliche Gelatine-Lösung zu entfernen. Die Beschichtung wurde jeweils kurz vor der Verwendung des Zellkulturmaterials durchgeführt.

Für die Kultivierung von MEH wurden Zellkulturschalen und -platten mit einer Kollagenbeschichtung verwendet. Hierfür wurde Kollagen mit einer Endkonzentration von 20 µg/ml in 0,2 % (v/v) Essigsäure gelöst und die Wachstumsfläche mit einer entsprechenden Menge der Lösung für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte ein dreifaches Waschen mit PBS um die Reste der Kollagen-Lösung zu entfernen. Die beschichteten Zellkulturmaterialien konnten unter sterilen Bedingungen für bis zu einen Monat gelagert werden.

3.11.2 ZELLZAHLBESTIMMUNG

Für eine größtmögliche Vergleichbarkeit von Experimenten innerhalb einer Experimentenreihe wurde die gleiche Anzahl an Zellen zu Beginn jedes Versuches ausgesät. Hierzu wurden adhärente Zellen mit einer Konfluenz von 80-90 %, nach einmaligem Waschen mit PBS, mit 2,5 ml Trypsin-EDTA inkubiert und von den Zellkulturschalen abgelöst. Anschließend erfolgte ein Abstoppen der proteolytischen Aktivität und ein Vereinzeln der Zellen durch Auf- und Abpipettieren mit 5 ml DMEM^{+/+}. Danach wurden 30 µl der Zellsuspension mit 30 µl 0,5 % (w/v) Trypanblau-Lösung versetzt und in einem Zellzählgerät untersucht. Trypanblau ermöglicht es lebende von toten Zellen zu unterscheiden, da der Farbstoff die intakte Zellmembran von lebenden Zellen nicht durchdringen kann. Tote Zellen erscheinen durch die Färbung blau. Für die Aussaat der Zellen wurde lediglich die Lebendzellzahl verwendet und entsprechend dieser Konzentration der Zellsuspension ein definiertes Volumen auf neue Zellkulturplatten überführt.

3.11.3 KRYOKONSERVIERUNG

Die Kryokonservierung von eukaryotischen Zellen ermöglicht eine langfristige Lagerung. Hierfür müssen die Zellen in einem speziellen Einfriermedium, welches die Formation von Eiskristallen und somit die mechanische Lyse beim Einfrieren innerhalb der Zellen verhindert, suspendiert sein. Dafür wurden Zellen mit einer Konfluenz von 80-90 % mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin-EDTA inkubiert und von der Zellkulturschale abgelöst. Nach dem Abstoppen der Proteolyse durch die Zugabe von 5 ml DMEM^{+/+} wurden die Zellen für 5 min bei 200 x g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das Kulturmedium wurde daraufhin entfernt und das entstandene Zellpellet in 1 ml Einfriermedium (*Biofreeze*) aufgenommen. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein Kryoröhrchen überführt und in einem Einfrierbehälter, welcher mit Isopropanol gefüllt war und dadurch eine gleichmäßige Abkühlung der Zellen ermöglichte, für 48 h bei -80 °C gelagert. Danach wurden die Zellen in einem Behälter mit flüssigem Stickstoff bei einer Temperatur von etwa -196 °C dauerhaft gelagert.

Für das Auftauen und erneute Kultivieren von langfristig gelagerten Zellen wurde das Kryoröhrchen, mit der Zellsuspension, aus dem Stickstofftank schnellstmöglich in einem Wasserbad mit einer Temperatur von 37 °C erwärmt. Sobald die gefrorene Zellsuspension

aufgetaut war, wurde diese in 10 ml Zellkulturmedium überführt und über 24 h kultiviert. Anschließend erfolgte das Passagieren dieser Zellen und eine reguläre Kultivierung.

3.11.4 TRANSIENTE TRANSFEKTION

Die transiente Transfektion von HEK293T-Zellen erfolgte mit Hilfe des Transfektionsreagenzes TurboFect™. Hierbei wurden ausgewählte Expressionsvektoren mit dem Reagenz versetzt, wodurch diese mit den löslichen kationischen Polymeren des Reagenzes stabile positiv geladene Komplexe bildeten. Diese schützten die DNA vor Degradation und erleichterte die Aufnahme des Expressionsvektors durch die eukaryotische Zelle.

Für die Transfektion wurden HEK293T-Zellen in einer 12-Well-Platte ausgesät und für 24 Stunden kultiviert. Anschließend wurde der Expressionsvektor mit DMEM ohne Zusätze und TurboFect in folgendem Verhältnis versetzt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert:

	DMEM	Plasmid	TurboFect
Einfachtransfektion	100 µl	1000 ng ANO6/ANO6 D408G	2 µl
Doppeltransfektion	100 µl	500 ng AP-Substrat + 1000 ng ANO6/ANO6 D408G	3 µl
Dreifachtransfektion	100 µl	500 ng AP-Substrat + 500 ng ANO6 + 500 ng P2X7-Rezeptor	3 µl

Nach der Formation des DNA-Polymer-Komplexes wurde das Kulturmedium der HEK293T-Zellen in jedem Well gegen 1 ml frisches DMEM^{+/+} ersetzt und der Transfektionsansatz wurde dazugegeben. Anschließend wurden die Zellen nach 24 bzw. 48 Stunden für weitere Experimente genutzt.

3.11.5 INHIBITION UND STIMULATION IN ZELLKULTUREXPERIMENTEN

Die Inkubation mit Stimulanzien und/oder Inhibitoren von Zellen wurden jeweils in DMEM ohne Zusätze durchgeführt um mögliche Einflüsse u.a. durch Antibiotika oder Wachstumsfaktoren im FCS auszuschließen. Die Zellen wurden je nach Versuchsreihe

gegebenenfalls mit einem Expressionsvektor transfiziert oder falls nicht anders gekennzeichnet, mit der entsprechenden Zellzahl ausgesät und kultiviert. Wurden die Zellen sowohl mit einem Inhibitor und als auch einer Stimulanz versetzt, so wurde der Inhibitor bereits 15 min vor Zugabe des Stimulus inkubiert.

Folgende Inhibitoren und Stimulanzen wurden in gekennzeichneter Konzentration verwendet:

Tabelle 14: Inhibitoren und Stimulanzen

	Bezeichnung	Verwendung	Eingesetzte Konzentration
Inhibitoren	AEBSF	Serin-Protease-Inhibitor	100 μ M
	MM	Breitband-Metalloprotease-Inhibitor	10 μ M
	GI	Spezifischer ADAM10-Inhibitor	3 μ M
	GW	ADAM10/17-Inhibitor	3 μ M
	Lactadherin	Spezifischer PS-Inhibitor	1 μ M; 2 μ M
	O-phospho-L-Serin (OPS)	Kompetitiver Inhibitor für oberflächenexponiertes PS	10 mM; 20 mM; 30 mM
	ADAM17 blockierender Antikörper D1	Spezifischer ADAM17-Inhibitor	200 nM
Stimulanzen	IO	Kalzium-Ionophor	0,5 mM; 1 mM
	Mel	Bienengift-Komponente	1 μ M
	PMA	Proteinkinase C-Aktivator	200 ng/ml; 300 ng/ml
	ATP	P2X7-Rezeptoragonist	1 mM

3.12 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN

3.12.1 ALKALISCHER PHOSPHATASE ASSAY

Für den Nachweis der proteolytischen Aktivität von ADAM10 und ADAM17 wurden spezifische Substrate dieser Proteasen, gekoppelt an eine alkalische Phosphatase (AP) in deren extrazellulärer Domäne, in HEK293T-Zellen transfiziert (Kapitel 3.11.4). Die Aktivität der in den Überstand des Stimulationsmediums freigesetzten AP-Substrate und der ungeschnittenen AP-Substrate, welche sich noch auf der Zelloberfläche befinden, kann in ein Verhältnis gesetzt werden. Hierdurch ist eine Aussage über die proteolytische Aktivität von ADAM10 und -17 möglich.

Hierzu wurden die transfizierten Zellen mit dem entsprechenden, zu untersuchenden Inhibitor bzw. Stimulanz in einem Gesamtvolumen von 400 µl behandelt. Nach einer gekennzeichneten Inkubationszeit wurden die Überstände der behandelten Zellen in ein Reaktionsgefäß transferiert und bei 15.000 rpm, 4 °C für 5 min zentrifugiert. Währenddessen wurden pro Well 300 µl Lysepuffer zu den behandelten Zellen gegeben und auf einem Plattenschüttler für 30 min lysiert.

Lysepuffer	EDTA	1 mM
	1,10-Phenanthrolin	10 mM
	Triton X-100	2,5 % (v/v)

Der zentrifugierte Überstand wurde wiederum in ein Reaktionsgefäß überführt und davon wurden jeweils 100 µl in eine 96-Well-Platte übertragen. In die Reaktionsgefäße, in denen die Überstände zum ersten Mal zentrifugiert wurden und sich dadurch eventuell ein Pellet abgelöster Zellen befand, wurde nach dem Ende der Inkubationszeit das entsprechende Zelllysats überführt und für weitere 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 15.000 rpm, 4 °C für 5 min und 10 µl dieses Lysats wurden in die 96-Well-Platte, in der sich auch die Überstände befanden, überführt.

Alkalische Phosphatase (AP)- Puffer	NaCl	100 mM
	MgCl ₂	20 mM
	TRIS	100 mM
	pH	9,5

Danach wurden die Lysate mit 90 µl AP-Puffer aufgefüllt und sowohl die Überstände, als auch die Lysate jeweils mit 100 µl einer 1 mg/ml AP-Substratlösung versetzt. Unter diesen Bedingungen setzt das Enzym das Substrat um, wobei es zu einem Farbumschlag kommt. Dieser kann mit Hilfe eines Photometers mittels der Absorption bei einer Wellenlänge von 405 nm bestimmt werden. Es wurden jeweils technische Triplikate gemessen.

3.12.2 ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)

Beim *Sandwich*-ELISA handelt es sich um eine Antikörper-basierte Methode, die zum spezifischen Nachweis eines Proteins genutzt werden kann. Zu Beginn wurde eine 96-Well-Platte mit dem sogenannten *Capture*-Antikörper, welcher gegen ein Antigen eines ausgewählten Proteins gerichtet ist, beschichtet. Anschließend wurde diese Platte mit einer BSA-Lösung blockiert, der zu untersuchenden Probe inkubiert und mehrfach gewaschen. Danach wird ein Biotin-gekoppelter Antikörper, der *Detection*-Antikörper, welcher ein anderes Antigen des gleichen Proteins bindet, inkubiert. Nach einer entsprechenden Inkubationsdauer und erneutem Waschen wurde eine mit Streptavidin gekoppelte Peroxidase in jedes Well zugegeben. Dieses Enzym wurde dazu genutzt ein Substrat unter der Bildung eines chromogenen Produktes umzusetzen. Dieser Umsatz steht im direkten Verhältnis zur Menge des gesuchten Proteins innerhalb der zu untersuchenden Probe.

In dieser Arbeit wurden DuoSets der Firma R&D Systems entsprechend den Herstellerangaben verwendet (Kapitel 3.4). Der Umsatz des Peroxidase-Substrates wurde nach Abstoppen der enzymatischen Reaktion mit Schwefelsäure anhand der Absorption bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Als Referenzwellenlänge diente die Absorption bei 620 nm. Jede Probe wurde in Duplikaten als technisches Replikat bestimmt.

3.12.3 FLUORESZENZ-PEPTIDSUBSTRAT-ASSAY

Der Fluoreszenz-Peptidsubstrat-Assay dient dem Nachweis der katalytischen Aktivität von ADAM17 anhand eines löslichen Peptids, welches die Schnittstelle von TNF-alpha enthält. Dieses Substrat enthält einen Fluoreszenzhemmer, welcher durch die Spaltung des Substrats der entsprechenden Protease entfernt wird und dadurch ein Fluoreszenzsignal messbar ist.

Für die Untersuchung wurden MEH auf kollagenisierten Lumox-Platten ausgesät und 48 h kultiviert. Nach der Kultivierung erfolgte ein Waschschrift mit PBS und die Zellen wurden für 10 min mit einer 1:5000 Hoechst 33342-Lösung (in PBS) gefärbt. Anschließend erfolgte ein erneutes Waschen der Zellen mit PBS. Nach der Inkubation der Zellen mit gekennzeichneten Inhibitoren (AEBSF, GI, GW) wurden die Zellen mit einer 5 μ M Lösung des fluorogenen Peptidsubstrats (in DMEM) für 2h in einen Fluoreszenzmessgerät inkubiert. Die Fluoreszenz wurde wie folgt gemessen:

	Exzitation	Emission
Hoechst 33342	361 nm	486 nm
Fluorogenes Peptidsubstrat	485 nm	530 nm

3.12.4 FLUORESZENZFÄRBUNG

Um auf der Oberfläche der Zellmembran exponiertes Phosphatidylserin nachzuweisen, wurde dieses mit Annexin V- Alexa Fluor 568, einem Konjugat aus dem PS-bindenden Annexin V und dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor 568, gefärbt. Der Farbstoff kann die Zellmembran lebender Zellen nicht durchdringen und färbt deshalb nur auf der Oberfläche befindliches PS an.

Zum Nachweis wurden HEK293T-Zellen auf *ibiTreat μ -slide*, Polymerplatten die speziell für Zellkulturexperimente bearbeitet wurden, ausgesät. Für MEH-Zellen wurden Glas *ibidi μ -slide*-Platten ohne Kollagenbeschichtung verwendet. Die zu färbenden Zellen wurden nach einer gekennzeichneten Behandlung einmalig mit 1x ABB gewaschen und anschließend direkt im Dunkeln mit einer 1:20 verdünnten Annexin V-Lösung für 10 min bei Raumtemperatur gefärbt.

10x Annexin Binding Buffer (ABB)	HEPES	0,1 M
	NaCl	1,4 M
	CaCl ₂	25 mM

Nach der Inkubation des Farbstoffes wurden die Zellen dreifach mit 1x ABB gewaschen um nicht gebundenes Annexin zu entfernen. Im Anschluss wurde einmalig mit PBS gewaschen und die Zellen wurden mit einer 3 % (v/v) Paraformaldehyd-Lösung (PFA) fixiert. Die Fixierung

erfolgte im Dunkeln für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Danach wurden die fixierten Zellen einmalig mit PBS gewaschen und anschließend mit dem Nukleinsäure-Farbstoff Hoechst 33342 (1:5000 in PBS) für 5 min bei Raumtemperatur gefärbt. Abschließend wurden die Zellen dreimal mit Wasser gewaschen und mit *ibidi mounting medium*, welches das Ausbleichen von Fluoreszenzfarbstoffen verhindert und die Zellen für die Lagerung stabilisiert, überschichtet. Die Analyse der Zellen erfolgte mit Hilfe des konfokalen Fluoreszenzmikroskops FV1000 der Firma Olympus.

3.12.5 QUANTIFIZIERUNG VON FLUORESZENZSIGNALEN

Eine Quantifizierung der Fluoreszenzaufnahmen wurde mit Hilfe des Programmes ImageJ Version 1.51 durchgeführt. Hierbei wurde das Fluoreszenzsignal des Farbstoffes Annexin V-Alexa Fluor 568 jeder Aufnahme über dessen Hintergrund bestimmt. Anschließend wurde dieses Signal in Korrelation zur Zellzahl, welche anhand des nukleären Farbstoffes Hoechst 33342 bestimmt werden konnte, gesetzt. Somit kann in Relation zu entsprechenden Kontrollzellen eine Aussage zur Veränderung des Fluoreszenzsignals, welches in direktem Verhältnis zum exponierten PS steht, getroffen werden. Für alle Experimentenreihen wurden mindestens drei technische und biologische Replikate durchgeführt. Innerhalb einer Experimentreihe wurden die gleichen Laserkonfigurationen verwendet.

3.13 PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN

3.13.1 PROTEINEXTRAKTION AUS ZELLEN

Für die Analyse von Proteinen mittels immunologischer Methoden, u.a. dem *Western Blot*, mussten diese entsprechend extrahiert werden. Hierfür wurden das Kulturmedium bzw. der Stimulationsansatz entsprechender Zellen entfernt und diese einmalig mit PBS gewaschen. Anschließend wurden diese Zellen mit 200 µl Lysepuffer versetzt und zur mechanischen Lyse kurzzeitig bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren und danach wieder aufgetaut.

Lysepuffer	TRIS	5 mM
	EGTA	1 mM
	Saccharose	250 mM
	Triton X-100	1 % (v/v)
	1,10-Phenanthrolin	10 mM
	cOmplete™, Protease- Inhibitor-Mix	1 x
	PhosSTOP™, Phosphatase- Inhibitor-Mix	1 x

Im Anschluss wurden die restlichen intakten Zellen mit Hilfe eines Zellschabers von der Zellkulturplatte abgelöst und das Zelllysat in ein Reaktionsgefäß überführt. Zusätzlich wurde das Lysat mit einer Amplitude von 70 % und einem 50 %-Zyklus für 5 s sonifiziert. Im Anschluss erfolgte eine Zentrifugation bei 15.000 rpm für 5 min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Der Überstand wurde anschließend in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Eine langfristige Lagerung der Proben erfolgte bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.13.2 QUANTIFIZIERUNG DES PROTEINGEHALTES

Der Proteingehalt der Zelllysate wurde basierend auf der Methode des *Pierce 660 nm Protein Assay* bestimmt. Hierbei wurden innerhalb eines Wells einer 96-Well-Platte 6 µl des Lysates mit 100 µl des 660 nm-Reagenzes versetzt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Absorption des gebildeten Protein-Farbstoff-Komplexes bei einer

Wellenlänge von 660 nm gemessen. Der Proteingehalt wurde anhand eines ebenfalls getesteten Proteinstandards ermittelt.

3.13.3 SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE

Um die zu untersuchenden Proteine anhand ihrer Größe aufzutrennen, wurde das für 30 µg Protein entsprechende Volumen der Proteinsuspension, des zuvor bestimmten Zelllysates, mit einem SDS-Probenpuffer im Verhältnis 5:1 versetzt.

6x SDS-Probenpuffer	TRIS	0,75 M
	SDS	12 % (w/v)
	Glycerin	6,54 M
	EDTA	6 mM
	DTT	120 mM
	Bromphenolblau	0,15 % (w/v)
	pH	6,8

Im Anschluss wurde dieses Gemisch für 5 min bei 95 °C aufgeköcht. Sollten innerhalb dieser Proben Proteine der Familie der Anoctamine untersucht werden, so wurden diese Proben nur auf eine Temperatur von 55 °C erhitzt. Durch diese Verarbeitung der Proteinsuspension wurde sichergestellt, dass die Proteine innerhalb der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nur nach ihrer Größe aufgetrennt werden.

Innerhalb der SDS-PAGE wurde ein diskontinuierliches Gelsystem, bestehend aus einem Sammelgel und Trenngel unterschiedlicher Acrylamid-Konzentrationen und pH-Werte, verwendet. Die Gele wurden wie folgend in einem vertikalen Gelsystem hergestellt:

Sammelgelpuffer	TRIS	0,5 M	2,5 ml
	SDS	0,4 % (w/v)	
	pH	6,8	
Sammelgel (4,5 %)	Acrylamid		1,7 ml
	Wasser		5,8 ml
	APS		60 µl
	TEMED		30 µl

	TRIS	1,5 M	
Trenngelpuffer	SDS	0,4 % (w/v)	2,5 ml
	pH	8,8	
	Trenngel (10 %)		
	Acrylamid		3,3 ml
	Wasser		4,0 ml
	APS		60 µl
	TEMED		30 µl

Die zuvor aufgearbeiteten Proben wurden nach vollständiger Polymerisation der Gele und dem Füllen der Gelkammer mit 1x SDS-Laufpuffer in jeweils eine Tasche des entsprechenden Gels überführt. Neben den Proben wurde ebenfalls ein Größenstandard mitgeführt.

1x SDS-Laufpuffer	TRIS	25 mM
	Glycin	192 mM
	SDS	0,1 % (w/v)
	pH	8,8 - 8,9

Nach dem Beladen des Gels wurde eine Spannung von 100 V an das Gelsystem angelegt und die Proben liefen entsprechend ihrer Ladung, wodurch sie durch das Polyacrylamidgel anhand ihrer Größe aufgetrennt wurden. Die Dauer der Elektrophorese wurde nach Bedarf und anhand der Lauffront des Bromphenolblaus eingeschätzt.

3.13.4 WESTERN BLOT

Im Anschluss an die Elektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine innerhalb des Gels auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran übertragen. Dieser Prozess wird auch als *Western Blotting* bezeichnet. Hierbei wurde die Membran durch eine Inkubation in reinem Methanol aktiviert und somit für Proteine bindend. Anschließend wurden sowohl die Membran als auch das Gel in Transferpuffer äquilibriert.

1x Transferpuffer	TRIS	25 mM
	Glycin	192 mM
	Methanol	10 % (v/v)
	pH	8,2 - 8,4

Für den Transfer wurde die Methode des *Semi-Dry Blotting* angewandt. Hierbei werden vier *Whatman*-Filterpapiere in Transferpuffer getränkt. Anschließend erfolgt die Stapelung der Komponenten wie folgt: zwei *Whatman*-Filterpapiere, das Polyacrylamidgel, die PVDF-Membran und zwei *Whatman*-Filterpapiere. Während der Zusammensetzung der Komponenten wurde darauf geachtet, dass keine Luftblasen zwischen den einzelnen Schichten sind. Im Anschluss erfolgte der Proteintransfer, wobei anhand der Fläche der zu transferierenden Gele eine Stromstärke von $1,5 \text{ mA/cm}^2$ für 2 Stunden angelegt wurde.

1x TRIS-buffered saline with Tween20 (TBST)	TRIS	20 mM
	EDTA	1 mM
	NaCl	140 mM
	Tween20	0,1 % (v/v)
	pH	8,2 - 8,4

Nach dem abgeschlossenen Proteintransfer wurde die PVDF-Membran mit einer 5 % (w/v) Milchpulver-Lösung in 1x TBST inkubiert. Dies blockierte alle restlichen freien Proteinbindungsstellen der Membran.

3.13.5 IMMUNOLOGISCHE DETEKTION

Die auf die PVDF-Membran transferierten Proteine wurden im Anschluss an das Blocken der freien Bindungsstellen der Membran mit einem primären Antikörper, welcher sich gegen ein zu untersuchendes Protein richtet, inkubiert. Der primäre Antikörper wurde nach Herstellerangaben eingesetzt. Nach der entsprechenden Inkubation erfolgte ein dreifacher Waschschrift mit TBST für jeweils 10 min. Im Anschluss wurde ein sekundärer Antikörper, welcher sich gegen die Spezies des primären Antikörpers richtet und zur Signalamplifikation dient, für 1 h inkubiert. Der sekundäre Antikörper ist mit einer Peroxidase gekoppelt um die Detektion des Proteins zu ermöglichen. Für diese Detektion wurde das *ECL Select Western Blotting Detection Reagent* entsprechend der Herstellerangaben verwendet. Hierbei wurde durch die Peroxidase eine Chemilumineszenzreaktion katalysiert, welche mittels des Fusion FX7 Kamerasystems detektiert werden konnte.

3.13.6 STRIPPEN DER PVDF-MEMBRAN

Für die Detektion verschiedener Proteine auf einer PVDF-Membran müssen die bereits verwendeten Antikörper zuvor entfernt werden. Dieser Prozess wird als *Stripping* bezeichnet. Hierbei wurden sowohl der primäre als auch der sekundäre Antikörper mittels eines entsprechenden Puffers entfernt. Hierzu wurde die Membran mit 20 ml *Stripping* Puffer versetzt und für 30 min bei 60 °C inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit TBST für 10 min gewaschen und im Anschluss erneut mit Milchpulver-Lösung blockiert. Daraufhin konnte die Membran wiederholt mit entsprechenden Antikörpern inkubiert werden.

Stripping Puffer	TRIS	60 mM
	SDS	2 % (w/v)
	2-Mercaptoethanol	100 mM
	pH	6,7

3.14 KULTIVIERUNG VON BAKTERIEN

Für die Amplifikation von Expressionsvektoren wurde im Rahmen dieser Arbeit mit XL1-Blue, einem *Escherichia coli*-Stamm, gearbeitet. Diese wurden in LB-Medium bei 37 °C und unter einer ständigen Rotation von 200 rpm kultiviert. Eine Selektion der Ampicillin-resistenten Stämme erfolgte durch Zugabe von 100 µg/ml Ampicillin.

Für die Kultivierung spezifischer Klone wurden 50 µl einer Bakterienlösung auf eine LB-Agarplatte überführt und mit Hilfe eines Drigalski-Spatels verteilt. Mittels eines Ampicillin-Resistenzmarkers wurden nur Stämme mit ausgewählten Eigenschaften aufgezogen.

Lysogeny broth (LB-Medium)	NaCl	10 g/l
	Trypton/Pepton aus Casein	10 g/l
	Hefeextrakt	5 g/l
	pH	7
LB-Agar	NaCl	10 g/l
	Trypton/Pepton aus Casein	10 g/l
	Hefeextrakt	5 g/l
	Agar-Agar	15 g/l
	pH	7

3.14.1 KRYOKONSERVIERUNG

Für die langfristige Lagerung von XL1-Blue bzw. einzelner Klone wurden diese in 10 ml LB-Medium über Nacht kultiviert. Anschließend wurde die Bakterienlösung bei 500 x g für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Im Anschluss wurde das Kulturmedium abgesaugt und das Bakterienpellet in 2 ml Bakterien-Kryomedium sanft suspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt. Danach wurden diese bei -80 °C dauerhaft gelagert.

Bakterien-Kryomedium	LB-Medium	85 % (v/v)
	Glycerin	15 % (v/v)

3.14.2 TRANSFORMATION VON BAKTERIEN

Für die Amplifikation von Expressionsvektoren erfolgte eine Transformation der XL1-Blue mittels Elektroporation. Hierzu wurden 50 µl Bakteriensuspension und 1 µl des entsprechenden Vektors in eine Elektroporationsküvette überführt. Anschließend erfolgte ein elektrischer Puls von 1,8 kV mittels eines *MicroPulser*. Im Anschluss wurde die Bakteriensuspension in 200 µl SOC-Medium, welches auf eine Temperatur von 37 °C erwärmt wurde, transferiert und für 60 min bei 200 rpm und 37 °C inkubiert. Nach dieser Inkubation wurde der Ansatz auf einer LB-Agarplatte verteilt und über Nacht mit entsprechenden Selektionsmarkern kultiviert.

<i>Super Optimal broth with Catabolite repression (SOC-Medium)</i>	Hefeextrakt	5 g/l
	Trypton/Pepton aus Casein	20 g/l
	NaCl	10 mM
	KCl	2,5 mM
	MgCl ₂	10 mM
	MgSO ₄	10 mM
	Glukose	20 mM
	pH	7,5

3.15 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

3.15.1 PLASMIDPRÄPARATION

Zur Gewinnung von Plasmiden wurden die entsprechenden Klone der XL1-Blue-Stämme in 200 ml LB-Medium über Nacht kultiviert. Anschließend erfolgte die Plasmidpräparation mit Hilfe des *PureYield™ Plasmid Midiprep System* der Firma Promega. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

3.15.2 QUANTIFIZIERUNG VON DNA

Die DNA-Konzentration von Lösungen wurde mit Hilfe des Spektrophotometers *NanoDrop 1000* bestimmt. Hierbei misst das Gerät die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm und kann anhand dessen die Konzentration der Probe ermitteln. Die Reinheit dieser wurde mittels des Absorptionsverhältnisses der Wellenlängen 260 nm und 280 nm überprüft.

3.15.3 MUTATION VON PLASMIDVEKTOREN

Zur Erzeugung der Punktmutation D408G innerhalb von ANO6 wurde in einem ANO6-Expressionsvektor eine entsprechende Mutation mittels des *Quikchange II Site-Directed Mutagenesis Kit* der Firma Agilent Technologies durchgeführt. Die Anwendung erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers und folgende Mutationsprimer (Sigma-Aldrich, US) wurden verwendet:

Primer 1: 5´-GAACTTGAGTATGAATGGGGCACTGTTGAGTTACAGCAGG-3´

Primer 2: 5´-CCTGCTGTAACCAACAGTGCCCCATTCATACTCAAGTTC-3´

3.15.4 AGAROSE-GELELEKTROPHORESE

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten anhand ihrer Größe erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Hierfür wurden 2 % (w/v) Agarose in 1x TAE-Puffer gegeben und erwärmt bis sich eine homogene Lösung bildete. Anschließend wurde 1 µl Ethidiumbromid pro 100 ml Lösung zugesetzt und vermischt. Nach erfolgter Polymerisation des Gels in einer horizontalen Gelkammer wurde diese mit 1x TAE-Puffer befüllt. Danach wurden die zu untersuchenden

Proben, welche mit einem DNA-Ladepuffer versetzt waren, jeweils in eine Tasche des Gels überführt und die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 100 V für 1 h. Neben den Proben wurde ebenfalls ein Größenstandard mitgeführt.

10 x TAE-Puffer	TRIS	400 mM
	Acetat	200 mM
	EDTA	10 mM
	pH	8,0

3.15.5 DNA-SEQUENZIERUNG

Eine Sequenzierung von DNA-Fragmenten, PCR-Produkten oder Expressionsvektoren wurde mittels der Kettenabbruchmethode nach Sanger et al. durch das Institut für Klinische Molekularbiologie durchgeführt (Sanger u. a., 1977).

3.16 STATISTIK

Die statistische Auswertung der Daten dieser Arbeit erfolgte mit Hilfe des Programmes *Prism Software* Version 7. Alle Werte sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes ($M \pm SEM$) angegeben. Der Berechnung liegen mindestens drei unabhängige Versuchsreihen zu Grunde oder falls abweichend sind diese entsprechend gekennzeichnet. Es erfolgte eine einfaktorische Varianzanalyse (ANOVA) einschließlich eines Post-Hoc-Test nach Bonferroni. Im Rahmen der Untersuchung des ADAM17-3x-Modells wurde aufgrund des Einflusses des jeweiligen Genotyps eine zweifaktorielle ANOVA einschließlich eines Post-Hoc-Tests nach Bonferroni durchgeführt und ist entsprechend gekennzeichnet. Es wurde ein p-Wert von $\leq 0,05$ angewandt.

4 ERGEBNISSE

Die Funktion von ADAM17 ist sowohl im physiologischen als auch im pathophysiologischen Rahmen von großer Bedeutung. Zum einen ist die Protease essenziell für eine normale Entwicklung von Maus und Mensch, und zum anderen ist es mit einer Vielzahl von Krankheiten und deren Progression assoziiert (Blaydon u. a., 2011; Blobel, 2005; Canault u. a., 2010; Chalaris u. a., 2010; Schmidt u. a., 2018). Doch trotz dieses weitreichenden Einflusses von ADAM17 ist der genaue Aktivierungsmechanismus bis heute nicht aufgeklärt. Innerhalb der letzten Jahre kam eine neuartige Hypothese, welche eine essenzielle Bedeutung von Phosphatidylserin (PS) für die Aktivität von ADAM17 beschreibt, unterstützt von in vitro Daten, auf (Sommer u. a., 2016a). Hierbei ist eine Exposition von PS auf der extrazellulären Seite der Zellmembran und einer anschließenden Interaktion mit dem polykationischen RKGK-Motiv innerhalb der MPD von ADAM17 für dessen Shedding-Aktivität notwendig. Im Rahmen dieser Arbeit und auf Grundlage dieser neuen Hypothese wurde die Beteiligung von Anoctamin-6 (ANO6) als mögliche Scramblase im Aktivierungsprozess und die in vivo-Relevanz des RKGK-Motivs von ADAM17 anhand eines dafür konzipierten Mausmodells untersucht.

4.1 EINFLUSS VON ANOCTAMIN-6 AUF DIE ADAM17-VERMITTELTE SUBSTRATFREISETZUNG

Um einen möglichen Einfluss von ANO6 auf die Aktivität von ADAM17 zu untersuchen, war es zunächst nötig ein Modellsystem zu generieren. Hierzu wurden HEK293T-Zellen mit einem Vektor, welcher für ANO6 mit einem eGFP-Marker codiert, transfiziert (Anhang Abbildung 26). Anschließend sollte die Expression mittels *Western Blot* überprüft und dessen beschriebene Scramblase-Funktion für ANO6 getestet werden (Gyobu u. a., 2017; Nagata u. a., 2016; Suzuki u. a., 2013; Yu u. a., 2015). Die Aktivität von ANO6 als Scramblase ist dabei abhängig von einem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration, welche mit Hilfe einer Stimulation der Zellen mit dem Kalziumionophor Ionomycin (IO) erzeugt wurde (Tian u. a., 2012) (Abbildung 8). Bei einer Eignung des Systems sollte anschließend die mögliche Regulation der PS-Externalisierung durch ANO6 auf die Shedding-Aktivität von ADAM17 untersucht werden.

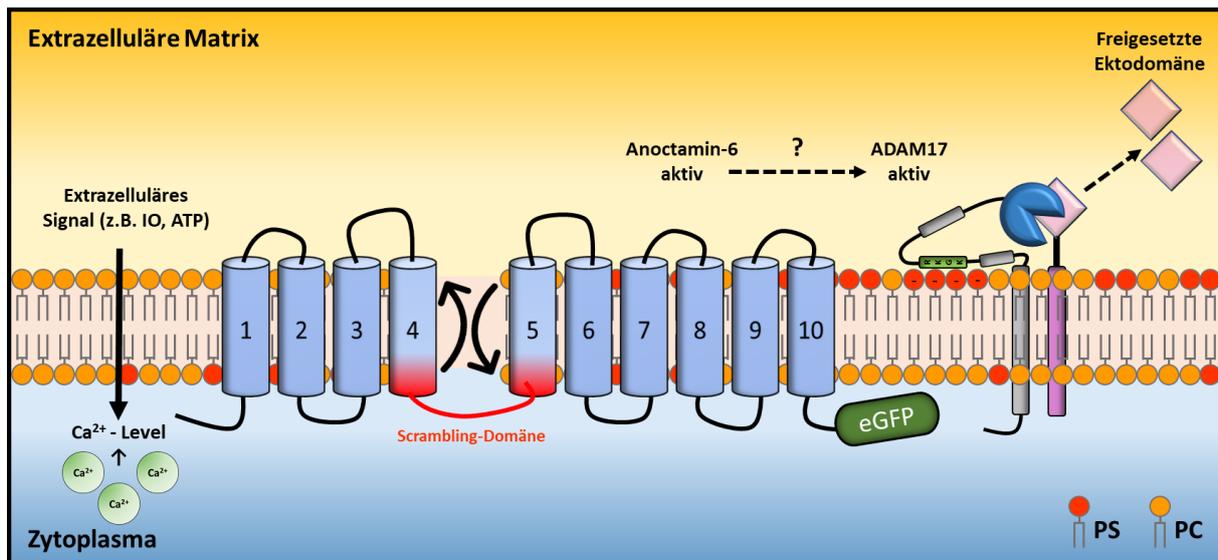


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Aktivierung der Scramblase-Aktivität von Anoctamin-6-eGFP und der Shedding-Aktivität von ADAM17.

Die mit einem ANO6-Vektor und ADAM17-Substrat (AREG oder TGF-alpha) doppeltransfizierten HEK293T-Zellen exprimieren ANO6, welches mit einem N-terminalen zytosolischen eGFP markiert ist, und das entsprechende Substrat als Transmembranproteine. Durch eine Stimulation der Zellen, z.B. mit Ionomycin, kommt es zu einem Anstieg des intrazellulären Kalziumspiegels. Hierdurch wird die Scrambling-Aktivität von ANO6 ermöglicht und es kommt zu einer PS-Externalisierung. Durch das Exponieren von PS auf der extrazellulären Seite der Zellmembran kann es möglicherweise zu einer Interaktion zwischen PS und dem RKGK-Motiv von ADAM17 kommen. Dieser Vorgang wiederum ist essenziell für das ADAM17-vermittelte Shedding der entsprechenden Substrate.

4.1.1 DIE ÜBEREXPRESSION VON ANOCTAMIN-6 FÜHRT ZU EINER VERSTÄRKTEN PHOSPHATIDYLSERIN-EXTERNALISIERUNG

Durch eine Markierung von ANO6 mit einem eGFP-Marker war es möglich die transfizierten HEK293T-Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie auf deren PS-Externalisierung unter verschiedenen Bedingungen zu untersuchen. Hierfür wurden diese Zellen über einen Zeitraum von 30 min mit 0,5 μM IO inkubiert und anschließend mit Annexin V, welches spezifisch an PS bindet, gefärbt. Annexin V kann die intakte Zellmembran nicht durchdringen und konnte dadurch in diesem System genutzt werden um exponiertes PS anzufärben. Als Kontrolle dienten pcDNA3.1-transfizierte HEK293T-Zellen.

Die Stimulation der transfizierten Zellen führte in Gegenwart von ANO6-eGFP zu einem signifikanten Anstieg der PS-Externalisierung sowohl gegenüber unbehandelten transfizierten Zellen als auch gegenüber der entsprechend behandelten Kontrolle. Die IO-stimulierten pcDNA3.1-transfizierten Zellen wiesen ebenfalls einen signifikant höheren Anteil an exponiertem PS im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle auf (Abbildung 9A, B). Beide unbehandelten Gruppen wiesen augenscheinlich und nach einer quantitativen Auswertung

des Fluoreszenzsignals nachweislich kein konstitutiv exponiertes PS auf. Diese Ergebnisse bestätigten den Ausgangszustand einer Membran-Asymmetrie und das vorrangige Vorkommen von PS in der zytosolischen Schicht der Zellmembran. Des Weiteren zeigen sie, dass eine ANO6-Überexpression kalziumabhängig zu einer verstärkten PS-Externalisierung führt.

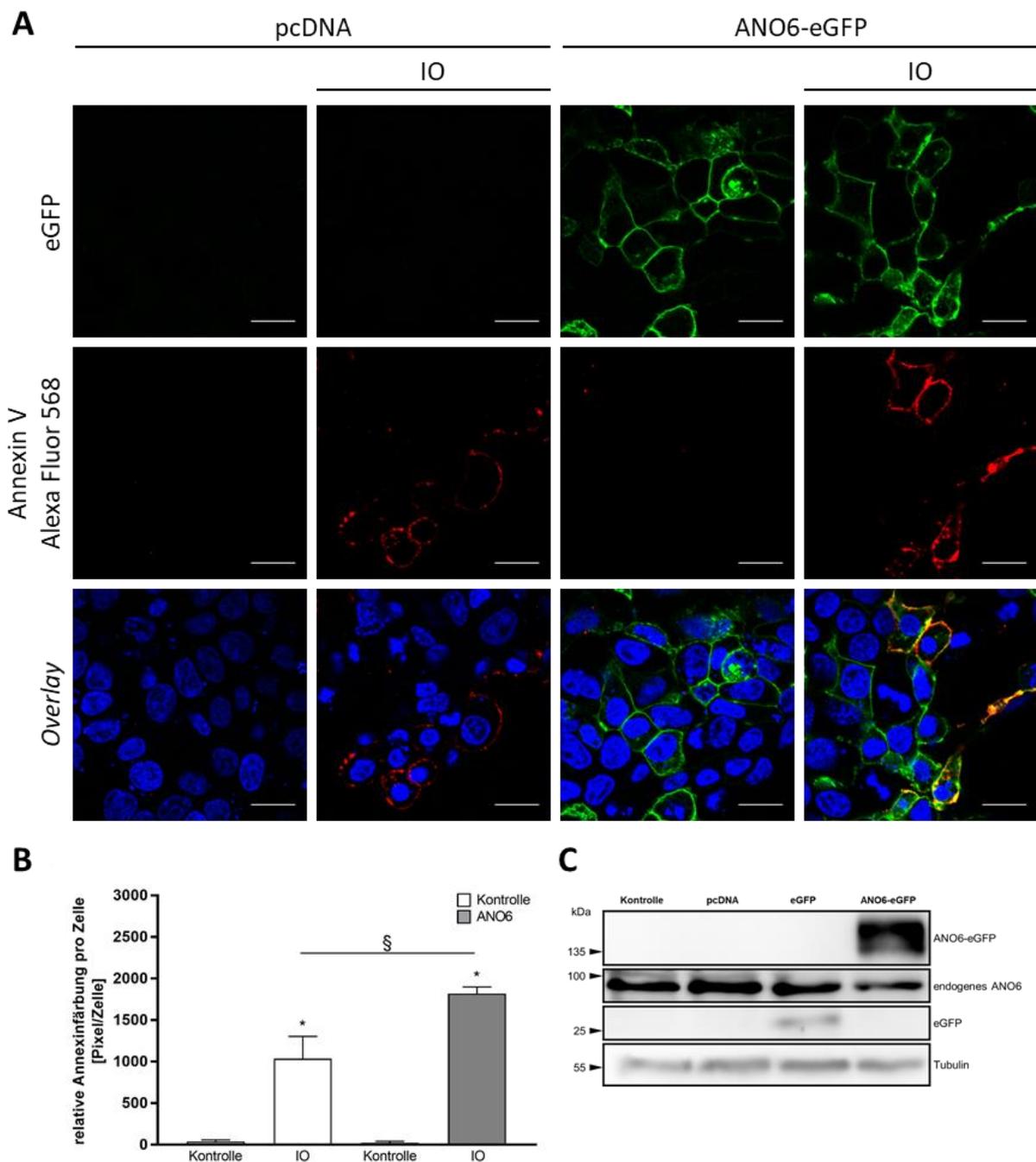


Abbildung 9: Anoctamin-6 erhöht kalziumabhängig die Phosphatidylserin-Externalisierung in HEK293T-Zellen. HEK293T-Zellen wurden mit pcDNA3.1 oder ANO6-eGFP (grün) transfiziert (48 h) und anschließend 30 min mit 0,5 μ M IO behandelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Nach der Stimulation wurden die Zellen mit Annexin V Alexa Fluor 568 (rot) angefärbt und fixiert (A). Eine Quantifizierung der PS-Externalisierung erfolgte anhand der Stärke der Fluoreszenzintensität von Annexin V gegenüber der Zellzahl, welche mit Hilfe des

Nukleinsäure-Farbstoffs Hoechst 33342 (blau) bestimmt wurde (B). Eine Kontrolle der Transfektion und eines entsprechenden Expressierens von eGFP, ANO6 und ANO6-eGFP erfolgte mittels *Western Blot* (C). Als Ladekontrolle diente Tubulin. Die dargestellten Aufnahmen sind repräsentativ für vier unabhängige Experimente. Der Maßstab entspricht 20 µm. Die Daten wurden mittels ANOVA und des Post-Hoc-Tests nach Bonferroni analysiert. *steht für einen signifikanten Anstieg in Bezug zur jeweiligen unbehandelten Kontrolle, § steht für einen signifikanten Anstieg gegenüber der pcDNA3.1-transfizierten Kontrolle. (n=4; ± SEM; p≤ 0,05)

Neben der visuellen Bestätigung von exprimiertem ANO6-eGFP in HEK293T-Zellen mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie wurde des Weiteren eine Expressionsanalyse mittels *Western Blot* durchgeführt. Hierbei konnte durch einen Antikörper, welcher gegen ANO6 gerichtet ist, endogen exprimiertes ANO6 jedoch nicht ANO6-eGFP nachgewiesen werden (Abbildung 9C). Möglicherweise blockierte der eGFP-Marker hierbei das Epitop des Antikörpers. Anhand dieser Färbung wird jedoch deutlich, dass HEK293T-Zellen endogen ANO6 aufweisen, was wiederum durch eine Transfektion mit ANO6-eGFP geringfügig reduziert war. Mit Hilfe eines GFP-gerichteten Antikörpers war es möglich ANO6-eGFP zu detektieren. Diese Ergebnisse veranschaulichen, dass das vorliegende System vermutlich durch die Anwesenheit von endogenem ANO6, auch ohne ANO6-eGFP-Überexpression, in der Lage ist kalziumabhängig PS zu externalisieren. Diese Vermutung wird durch das Ergebnis, dass bereits IO-stimulierte pcDNA3.1-transfizierte Zellen PS in signifikantem Ausmaß auf der Oberfläche exponieren, untermauert (Abbildung 9A, B).

4.1.2 DAS ADAM17-VERMITTELTE SHEDDING VON AREG- UND TGF-ALPHA WIRD DURCH ANOCTAMIN-6 IN ABHÄNGIGKEIT VON PHOSPHATIDYLSEIN ERHÖHT

Durch die Bestätigung, dass ANO6 eine kalziumabhängige Scramblase ist und nach Überexpression in HEK293T-Zellen die PS-Externalisierung erhöht, eignet sich dieses System um einen möglichen regulatorischen Einfluss auf die Shedding-Aktivität von ADAM17 zu untersuchen. Eine mögliche Assoziation zwischen ANO6 und ADAM17 kann bereits durch veröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe gezogen werden. Diese beinhalten, dass B-Lymphozyten aus Scott-Syndrom-Patienten im Gegensatz zur Kontrolle nicht in der Lage sind das ADAM17-Substrat L-Selektin kalziumabhängig freizusetzen (Sommer u. a., 2016a).

Für die Untersuchung eines möglichen regulatorischen Zusammenhangs zwischen ANO6 und ADAM17 wurden HEK293T-Zellen sowohl mit ANO6-eGFP als auch jeweils mit einem der ADAM17-Substrate Amphiregulin-AP (AREG) oder TGF-alpha-AP doppeltransfiziert. Diese Substrate sind extrazellulär mit einer alkalischen Phosphatase (AP) gekoppelt. Kommt es zu einer Freisetzung der Ektodomäne, gelangt das lösliche Fragment mit der AP in den Überstand

des Mediums. Anschließend kann durch Bestimmung der AP-Aktivität im Überstand und im Zelllysat eine Aussage über das ADAM17-vermittelte Shedding getroffen werden (Kapitel 3.12.1).

Nach einer erfolgreichen Transfektion wurden die Zellen in An- oder Abwesenheit von verschiedenen Inhibitoren 30 min mit 1 μ M IO stimuliert. Da die transfizierten Substrate nicht nur ausschließlich durch eine Protease freigesetzt werden können, dienen die Inhibitoren hierbei als Hilfsmittel um die beteiligten Proteasen und deren Anteil an der Substratfreisetzung zu beurteilen. Marimastat (MM) ist ein Breitband-Metalloprotease-Inhibitor, D1 ein spezifisch blockierender Antikörper gegenüber ADAM17, GI ein spezifischer ADAM10-Inhibitor und GW vorrangig ein ADAM17-Inhibitor, welcher mit geringerer Affinität ebenfalls ADAM10 inhibiert.

Die Ergebnisse zeigten, dass sowohl die IO-induzierte Freisetzung von AREG als auch die von TGF-alpha in ANO6-überexprimierenden Zellen im Vergleich zu eGFP-transfizierten Zellen signifikant erhöht ist. Das induzierte Shedding der beiden Substrate konnte jeweils komplett durch die Zugabe von MM gehemmt werden (Abbildung 10A, B). Dies bedeutet, dass die Freisetzung der Substrate lediglich durch Metalloproteasen erfolgt. Innerhalb von ANO6-transfizierten Zellen veränderte sich unter IO-Stimulation erstaunlicherweise die Beteiligung der jeweiligen Proteasen an der Substratfreisetzung deutlich gegenüber der Kontrolle. Das Shedding von AREG erfolgte in eGFP-transfizierten Zellen nahezu ausschließlich durch ADAM17. Dies wurde durch die fast vollständige Inhibition der Freisetzung mittels GW und D1 deutlich. In ANO6-eGFP-transfizierten HEK293T-Zellen war die AREG-Freisetzung unter IO-Stimulation signifikant erhöht, jedoch erfolgte das Shedding sowohl durch ADAM10 als auch ADAM17. Der Einfluss von ADAM10 war dabei signifikant erhöht, wie die Inhibition mittels GI zeigte (Abbildung 10A). Der Anteil an freigesetztem TGF-alpha wurde größtenteils durch ADAM10 produziert. Aber auch weitere, nicht näher definierbare Metalloproteasen und zu einem geringen Teil ADAM17 waren ebenfalls an der Freisetzung beteiligt. Dies wurde durch die starke Inhibition von GI und MM und die nur sehr geringe Effizienz von GW deutlich (Abbildung 10B).

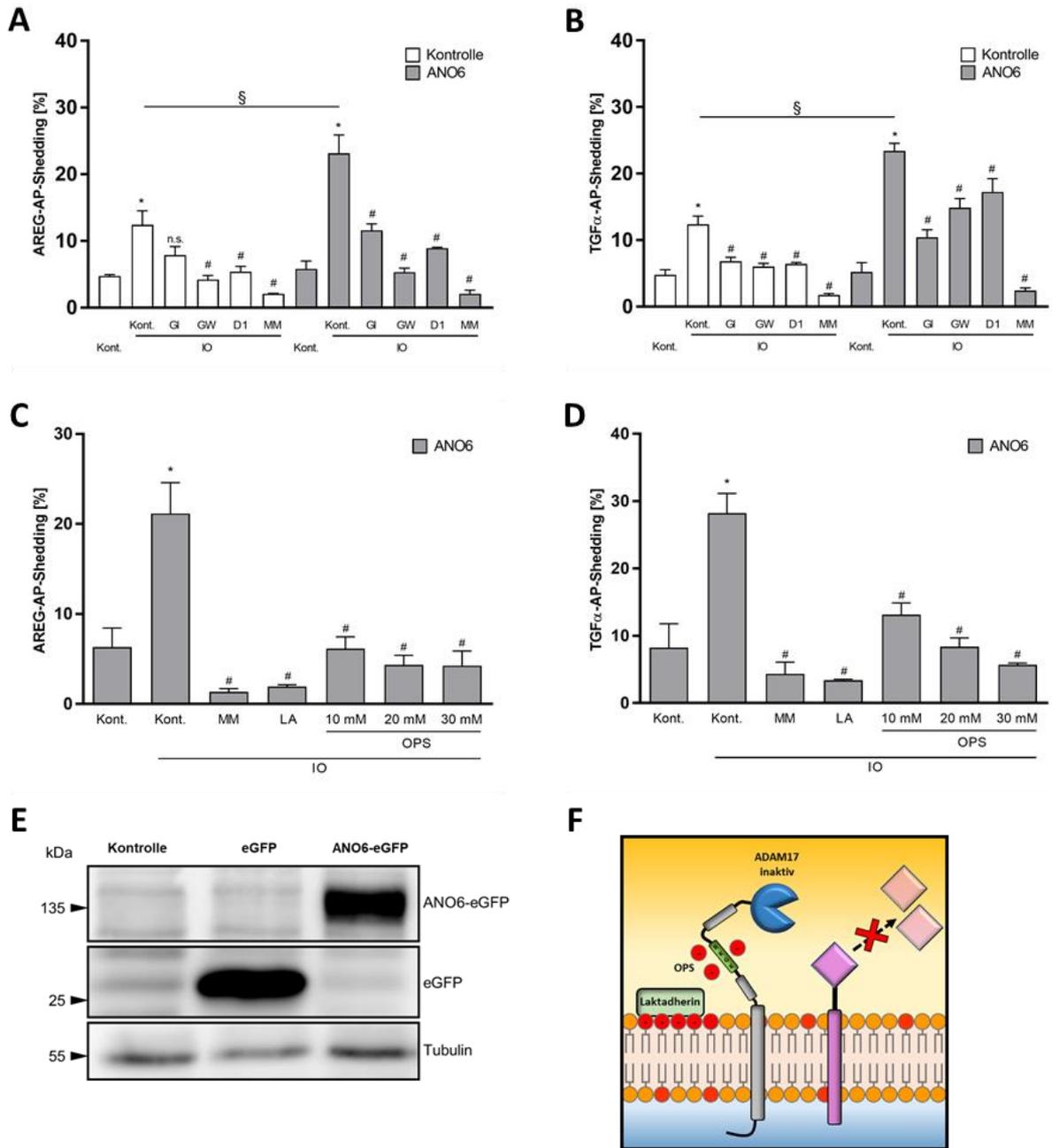


Abbildung 10: Anoctamin-6 erhöht Kalzium- und Phosphatidylserin-abhängig die Freisetzung von AREG und TGF-alpha. HEK293T-Zellen wurden mit ANO6-eGFP oder eGFP und jeweils einem der Substrate AREG-AP oder TGF-alpha-AP transfiziert (48 h). Die Stimulation erfolgte für 30 min mit 1 μ M IO in An- oder Abwesenheit von gekennzeichneten Inhibitoren (A, B, C, D). Die Inhibitoren GI (3 μ M), GW (3 μ M), MM (10 μ M), D1 (200 nM), OPS (10 – 30 mM) und LA (2 μ M) wurden jeweils 15 min vor der Stimulation mit IO inkubiert. Die Aktivität, der in den Überstand freigesetzten AP wurde im Verhältnis zur Summe der Aktivität aus dem Überstand und dem Zelllysat dargestellt (Shedding [%]) (A, B, C, D). Eine Kontrolle für die Expression von eGFP und ANO6-eGFP erfolgte mittels *Western Blot* und ist hier repräsentativ an einem *Blot* dargestellt (E). Als Ladekontrolle diente Tubulin. Die Wirkungsweise der Inhibitoren OPS und LA innerhalb der Aktivierung von ADAM17 ist schematisch dargestellt (F). OPS ist die lösliche Kopfgruppe von PS und kann mit dem RKGK-Motiv der MPD von ADAM17 interagieren. LA kann spezifisch an PS binden und somit exponiertes PS für eine Interaktion blockieren. Die Daten wurden mittels ANOVA und des Post-Hoc-Tests nach Bonferroni analysiert. *steht für einen signifikanten Anstieg in Bezug zur jeweiligen unbehandelten Kontrolle, § steht für einen signifikanten Anstieg gegenüber der eGFP-transfizierten Kontrolle, # steht für eine signifikante Reduktion in Bezug zur jeweiligen stimulierten Kontrolle, n.s. steht für ein nicht signifikantes Verhältnis zur jeweiligen Kontrolle. (n=4 (A, B); n=3 (C, D) \pm SEM; p \leq 0,05)

Für die daraus resultierende Frage, ob diese Substratfreisetzung in Abhängigkeit von exponiertem PS erfolgte, wurden ANO6-transfizierte und mit IO stimulierte Zellen zusätzlich mit den Inhibitoren O-Phospho-L-Serin (OPS) und Laktadherin (LA) inkubiert. OPS ist die lösliche Kopfgruppe von PS und kann dadurch kompetitiv mit dem RKGK-Motiv von ADAM17 interagieren und dieses blockieren. LA ist ein Protein, welches spezifisch PS bindet jedoch nicht die Zellmembran durchdringen kann und dadurch an extrazellulär exponiertes PS bindet und dessen Interaktion mit ADAM17 hemmt (Abbildung 10F). Sowohl bei der AREG- als auch bei der TGF-Freisetzung bewirkte die Inkubation mit 2 μM LA eine Inhibition dieser Freisetzung, welche vergleichbar mit der Wirkung von MM war. Das IO-induzierte Shedding innerhalb von ANO6-transfizierten Zellen war somit vollständig von PS abhängig. Die Wirkung von OPS auf das Freisetzen der Substrate war im Vergleich zu LA bei einer Konzentration von 30 mM etwas schwächer, jedoch auch signifikant verringert. Diese Ergebnisse verdeutlichen den essenziellen Einfluss von PS auf das ADAM17-vermittelte Shedding der Substrate und das ANO6 in Abhängigkeit von PS ADAM17 regulieren kann (Abbildung 10C, D).

Die Untersuchungen legten weiterhin nahe, dass ANO6-transfizierte Zellen unter Stimulation vermehrt Substrate mit der Beteiligung von ADAM10 freisetzen. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit von ADAM10 und ADAM17 ist ein ähnlicher Aktivierungsmechanismus in Abhängigkeit von PS denkbar. Dieser neue Ansatz wurde parallel in der Arbeitsgruppe analysiert und die Ergebnisse dieser Forschung zeigten, dass sich ein polykationisches Motiv innerhalb der *stalk*-Region von ADAM10 befindet und dieses mit PS interagieren kann (Bleibaum u. a., 2019). Sowohl ADAM10, als auch ADAM17 können somit durch exponiertes PS aktiviert werden und unterstützen dadurch die Beobachtung, dass durch eine verstärkte Externalisierung von PS mittels ANO6 auch ADAM10 vermehrt an der AREG- und TGF-alpha Freisetzung beteiligt ist (Abbildung 10A, B).

Die bisherigen Ergebnisse verdeutlichen, dass durch eine Überexpression von ANO6 die Substratfreisetzung bei einer entsprechenden Stimulation erhöht wird und dieser Effekt in Abhängigkeit von exponiertem PS auftritt. Um diesen Effekt eindeutig auf die Scramblase-Funktion von ANO6 zurückzuführen, wurden HEK293T-Zellen mit einer ANO6-Chimäre ohne Scrambling-Domäne (ANO6 ΔSD) transfiziert (Abbildung 11C). Hierbei handelt es sich um ein ANO6-Konstrukt, bei dem die Scrambling-Domäne (AS524-558) durch den korrespondierenden Bereich aus ANO1 (AS580-614) ersetzt wurde. Durch diesen Austausch verliert ANO6 die für die PS-Externalisierung benötigte Domäne und sollte dadurch

theoretisch keinen Einfluss auf die Shedding-Aktivität von ADAM10 und ADAM17 haben (Schreiber u. a., 2018; Yu u. a., 2015). Dieses Konstrukt wurde innerhalb einer Kooperation von Karl Kunzelmann bereitgestellt.

Für diese Experimente sind HEK293T-Zellen mit eGFP, ANO6-eGFP oder ANO6 Δ SD und jeweils einem der Substrate AREG-AP oder TGF-alpha-AP doppeltransfiziert worden. Die Freisetzung der Substrate wurde durch eine Stimulation mit 1 μ M IO für 30 min induziert und in An- bzw. Abwesenheit von GI und GW analysiert (Abbildung 11A, B). Wie bereits bei den vorherigen Experimenten stieg das Shedding der Substrate in den ANO6-eGFP transfizierten Zellen unter IO-Stimulation im Vergleich zur Kontrolle signifikant an. Die mit ANO6 Δ SD-transfizierten Zellen wiesen bei beiden Substraten keinen signifikanten Unterschied zu den entsprechenden eGFP-transfizierten Zellen auf. Bei der ADAM-vermittelten Freisetzung von AREG zeigten Zellen mit ANO6 Δ SD eine geringfügig höhere Beteiligung von ADAM10 im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 11A). Hierbei wurde deutlich, dass ANO6 Δ SD keinen regulatorischen Einfluss auf die Freisetzung von AREG hatte. Ähnlich war der Effekt auch bei den TGF-alpha-transfizierten Zellen. Zellen, die mit eGFP oder ANO6 Δ SD transfiziert und mit IO stimuliert wurden, wiesen keinen signifikanten Unterschied im Substrat-Shedding auf. Jedoch ähnelte das Muster der an der Freisetzung beteiligten Proteasen von ANO6 Δ SD-exprimierenden Zellen denen von ANO6-eGFP (Abbildung 11A). Sowohl ADAM10 als auch ADAM17 hatten bei der Freisetzung von TGF-alpha unter diesen Bedingungen keinen signifikanten Einfluss. Möglicherweise ist dieser Effekt auf eine Veränderung der Substrat-Enzym-Interaktion innerhalb der Zellmembran mittels ANO6 zurückzuführen. Diese Ergebnisse machen jedoch deutlich, dass die PS-Externalisierung mittels der Scrambling-Domäne von ANO6 ausschlaggebend für die signifikante Erhöhung der Aktivität von ADAM10 und ADAM17 ist (Abbildung 11A, B).

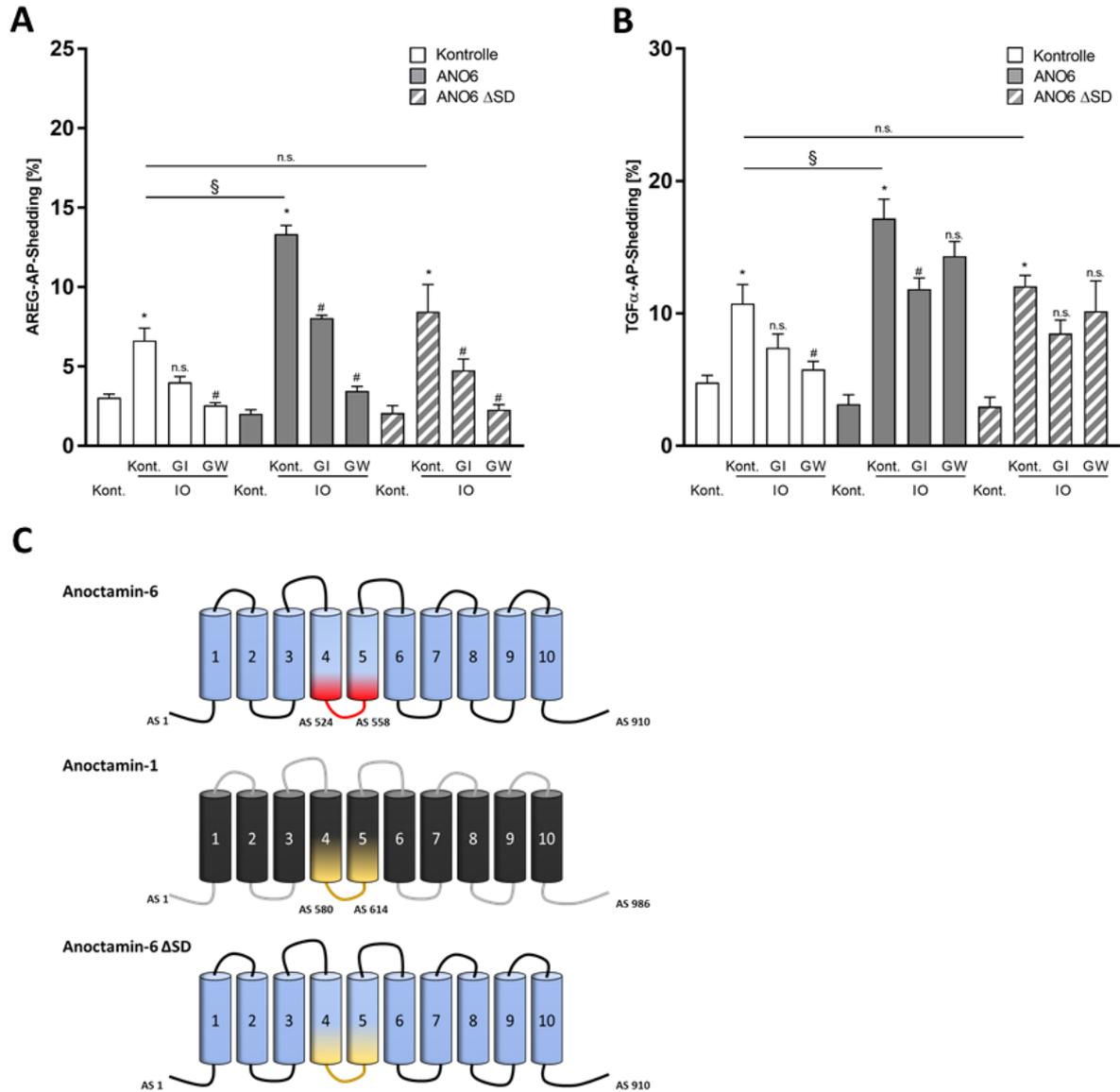


Abbildung 11: Einfluss der Scramblase-Domäne von Anoctamin-6 auf das ADAM-vermittelte Shedding. HEK293T-Zellen wurden mit ANO6 ΔSD, ANO6-eGFP oder eGFP und jeweils einem der Substrate AREG-AP oder TGF-alpha-AP transfiziert (48 h). Die Stimulation erfolgte für 30 min mit 1 μM IO in An- oder Abwesenheit von gekennzeichneten Inhibitoren (A, B). Die Inhibitoren GI (3 μM) und GW (3 μM) wurden jeweils 15 min vor der Stimulation inkubiert. Die Aktivität, die in den Überstand freigesetzten AP wurde im Verhältnis zur Summe der Aktivität aus dem Überstand und dem Zellysate dargestellt (Shedding [%]) (A, B). ANO6 ΔSD setzt sich aus der grundlegenden Sequenz von ANO6 (AS1-910) und dem zur Scrambling-Domäne von ANO6 (AS524-558) korrespondierenden Bereich aus ANO1 (AS580-614) zusammen. Die Bereiche sind schematisch dargestellt (C). Die Daten wurden mittels ANOVA und des Post-Hoc-Tests nach Bonferroni analysiert. *steht für einen signifikanten Anstieg in Bezug zur jeweiligen unbehandelten Kontrolle, § steht für einen signifikanten Anstieg gegenüber der eGFP-transfizierten Kontrolle, # steht für eine signifikante Reduktion in Bezug zur jeweiligen stimulierten Kontrolle, n.s. steht für ein nicht signifikantes Verhältnis zur jeweiligen Kontrolle. (n=3 (A, B); ± SEM; p ≤ 0,05)

4.1.3 ATP UND MELITTIN VERSTÄRKEN DIE SHEDDING-AKTIVITÄT VON ADAM10 UND ADAM17 DURCH ANOCTAMIN-6

Die bisher durchgeführten Experimente schlossen lediglich die artifizielle Erhöhung des intrazellulären Kalziumspiegels durch IO ein. Um die Aktivierung der Scramblase-Funktion von ANO6 unter weiteren Bedingungen zu untersuchen wurde ein größeres Spektrum an Stimulanzen getestet. Zum einen wurde Melittin (Mel), ein Bestandteil von Bienengift und dessen mögliche Regulation von ANO6 analysiert. Mel bewirkt über die Aktivierung von P2-Rezeptoren und durch eine Porenformation mittels Lipid-Protein-Interaktion innerhalb der Zellmembran einen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration (Van Den Bogaart u. a., 2008; Rady u. a., 2017; Sommer u. a., 2012; Tu u. a., 2008). Ein ähnliches Experiment aus der Literatur konnte bereits zeigen, dass Mel die Aktivität von ANO6 reguliert (Schreiber u. a., 2018). Zum anderen wurde Adenosintriphosphat (ATP) getestet um einen physiologischen Kontext im Vergleich zu IO und Mel zu simulieren. ATP bewirkt über die Aktivierung von P2-Rezeptoren einen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration (Kasuya u. a., 2017; Pupovac und Sluyter, 2016). Da in HEK293T-Zellen endogen kaum P2-Rezeptoren exprimiert werden, wurden für diese Untersuchungen Zellen mit dem P2X7-Rezeptor überexprimiert (Di Garbo u. a., 2012; Tsao u. a., 2013).

Somit wurden HEK293T-Zellen mit ANO6-eGFP oder eGFP und einem der Substrate AREG-AP oder TGF-alpha-AP für 48 h transfiziert und im Anschluss mit 1 μ M Mel (Abbildung 12A, B) oder 1 mM ATP (Abbildung 12C, D) für 30 min in An- oder Abwesenheit der Inhibitoren GI, GW oder MM stimuliert. Hierbei wiesen das AREG- und TGF-alpha-Shedding unter Mel-Stimulation einen signifikanten Anstieg bei einer ANO6-Überexpression auf. Die Mel-induzierte Freisetzung von AREG erfolgte nahezu vollständig durch ADAM17. Der Einfluss von ADAM10 bei einer Überexpression von ANO6 stieg auch signifikant im Vergleich zur Kontrolle an, dennoch wurde weiterhin der größte Anteil von ADAM17 freigesetzt (Abbildung 12A). Das Shedding von TGF-alpha unter Mel-Stimulation ähnelte dem Muster der IO-Stimulation. Zwar stieg der Anteil an freigesetztem TGF-alpha bei einer ANO6-Überexpression signifikant an, jedoch wurde ein größerer Anteil von nicht näher definierbaren Metalloproteasen prozessiert (Abbildung 12B). Dies legt die Vermutung nahe, dass neben ADAM10 und ADAM17 auch weitere Metalloproteasen durch PS-Externalisierung aktivierbar sind. Welche dies sein könnten und wie ein genauer Aktivierungsmechanismus aussehen könnte, war jedoch nicht aus diesen Untersuchungen ersichtlich.

Die Stimulation mit ATP führte wie auch mit Mel und IO zu einer signifikanten Erhöhung des AREG- und TGF-alpha-Sheddings bei einer ANO6-Überexpression (Abbildung 12C, D). Der P2X7-Rezeptor war hierbei essenziell um die Wirkung von ATP zu vermitteln. HEK293T-Zellen ohne den P2X7-Rezeptor wiesen bei einer ATP-Stimulation keinen Unterschied an freigesetztem AREG-AP und TGF-alpha-AP im Vergleich zu unstimulierten Zellen auf. Bei einer Überexpression von ANO6 in Gegenwart dieses Rezeptors war das ATP-induzierte Shedding signifikant angestiegen, wobei ADAM17 den größten Teil von AREG freisetzte. Der Einfluss von ADAM10 an der TGF-alpha-Freisetzung erhöhte sich bei der ATP-Stimulation ähnlich wie auch bei Mel und IO.

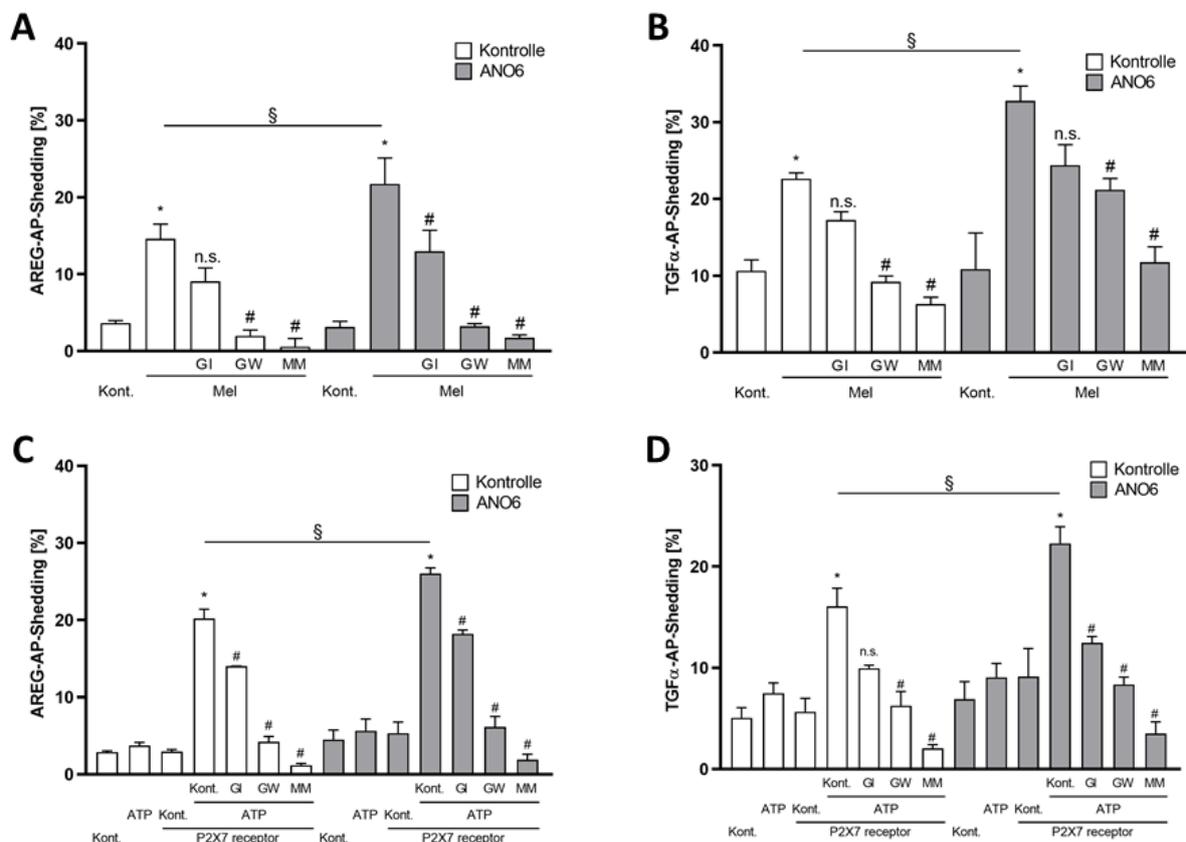


Abbildung 12: Melittin und ATP erhöhen in Abhängigkeit von Anoctamin-6 das AREG- und TGF-alpha-Shedding. HEK293T-Zellen wurden mit ANO6-eGFP oder eGFP und jeweils einem der Substrate AREG-AP oder TGF-alpha-AP transfiziert (48 h). Die Stimulation erfolgte für 30 min mit 1 μ M Mel (A, B) oder mit 1 mM ATP (C, D) in An- oder Abwesenheit von gekennzeichneten Inhibitoren. Die Inhibitoren GI (3 μ M), GW (3 μ M) und MM (10 μ M) wurden jeweils 15 min vor der Stimulation inkubiert. Die Aktivität, die in den Überstand freigesetzten AP wurde im Verhältnis zur Summe der Aktivität aus dem Überstand und dem Zelllysat dargestellt (Shedding [%]) (A, B, C, D). Die Daten wurden mittels ANOVA und des Post-Hoc-Tests nach Bonferroni analysiert. *steht für einen signifikanten Anstieg in Bezug zur jeweiligen unbehandelten Kontrolle, § steht für einen signifikanten Anstieg gegenüber der eGFP-transfizierten Kontrolle, # steht für eine signifikante Reduktion in Bezug zur jeweiligen stimulierten Kontrolle, n.s. steht für ein nicht signifikantes Verhältnis zur jeweiligen Kontrolle. (n=5 (A); n=3 (B, C, D) \pm SEM; $p \leq 0,05$)

Die Ergebnisse dieser Experimente zeigen, dass eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration durch IO, Mel oder ATP bei einer ANO6-Überexpression zu einem signifikanten Anstieg der Substratfreisetzung durch ADAM10, ADAM17 und möglicherweise auch anderen Metalloproteasen führt.

4.1.4 DIE PROTEINKINASE C-ABHÄNGIGE AKTIVIERUNG VON ADAM17 IST UNABHÄNGIG VON ANOCTAMIN-6

Eine sehr verbreitete Methode um das Substrat-Shedding durch ADAM17 zu aktivieren, ist eine Stimulation mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) (Le Gall u. a., 2010; Groth u. a., 2016a; Lorenzen u. a., 2016). PMA führt zu einer Aktivierung der Proteinkinase C (PKC), welche wiederum Phosphorylierungskaskaden in Gang setzen kann (Newton, 2003; Nishizuka, 1988; Robinson, 1992). Eine Aktivierung von ADAM17 mittels Phosphorylierung der zytosolischen Domäne durch die PKC kann anhand neuer Daten ausgeschlossen werden (Horiuchi u. a., 2007a; Reddy u. a., 2000). Diese zeigten u.a., dass die Entfernung der intrazellulären Domäne und damit aller möglichen intrazellulären Phosphorylierungsstellen von ADAM17 bis auf eine Länge von 6 AS weiterhin ein stimulierbares und funktionales ADAM17 zur Folge hat (Schwarz u. a., 2013). Die Tatsache, dass eine PMA-Stimulation zu einer PS-Externalisierung führt, könnte möglicherweise auf einen Mediator, z.B. eine Scramblase wie ANO6, welche durch die PKC aktiviert wird, hinweisen (Nguyen u. a., 2011; Sommer u. a., 2016a). Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass die PKC auch direkt mit PS interagieren kann (Verdaguer u. a., 1999).

Zur Untersuchung, ob eine PMA-Stimulation ANO6 reguliert, wurden wiederum eGFP- und ANO6-eGFP-transfizierte HEK293T-Zellen in An- oder Abwesenheit der Inhibitoren GI, GW und MM mit 300 ng/ml PMA für 30 min stimuliert. Die Aktivität der ADAMs wurde anhand der Substrate AREG-AP oder TGF-alpha-AP und deren Freisetzung in AP-Assays ausgewertet. Hierbei kam es zu keinem signifikanten Unterschied im Anteil von freigesetztem AREG oder TGF-alpha zwischen den eGFP- und ANO6-transfizierten Zellen (Abbildung 13A, B). Das Shedding von AREG erfolgte nach einer PMA-Stimulation nur durch ADAM17, was anhand der signifikant hemmenden Wirkung von GW deutlich wurde. TGF-alpha wurde hauptsächlich durch ADAM17 und nur zu einem geringen Anteil durch ADAM10 freigesetzt. Diese Ergebnisse machen deutlich, dass PMA ein potenter ADAM17-Aktivator ist, jedoch keinen Einfluss auf überexprimiertes ANO6 hat.

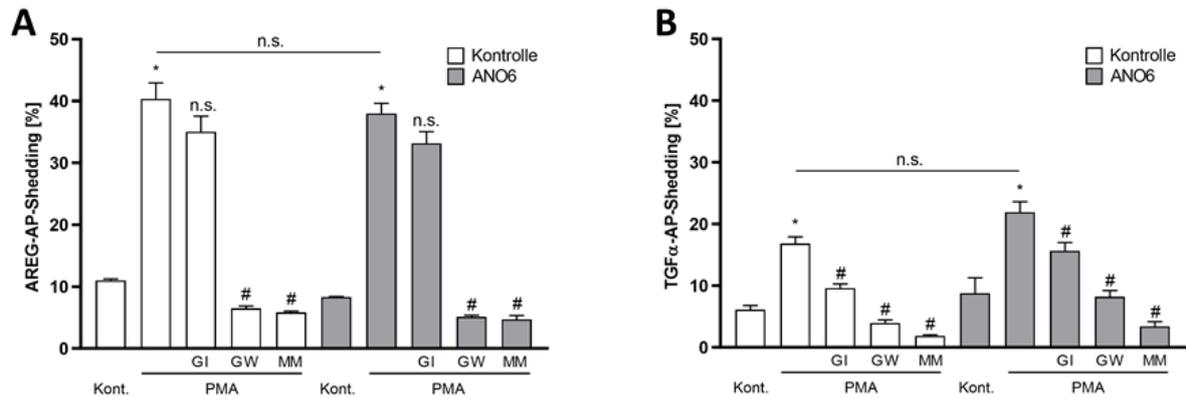


Abbildung 13: ANO6-Überexpression hat keinen Einfluss auf AREG- und TGF-alpha-Shedding unter PMA-Stimulation. HEK293T-Zellen wurden mit ANO6-eGFP oder eGFP und jeweils einem der Substrate AREG-AP oder TGF-alpha-AP transfiziert (48 h). Die Stimulation erfolgte für 30 min mit 300 ng/ml PMA (A, B). Die Inhibitoren GI (3 μ M), GW (3 μ M) und MM (10 μ M) wurden jeweils 15 min vor der Stimulation inkubiert. Die Aktivität, der in den Überstand freigesetzten AP wurde im Verhältnis zur Summe der Aktivität aus dem Überstand und dem Zelllysat dargestellt (Shedding [%]) (A, B). Die Daten wurden mittels ANOVA und des Post-Hoc-Tests nach Bonferroni analysiert. *steht für einen signifikanten Anstieg in Bezug zur jeweiligen unbehandelten Kontrolle, § steht für einen signifikanten Anstieg gegenüber der eGFP-transfizierten Kontrolle, # steht für eine signifikante Reduktion in Bezug zur jeweiligen stimulierten Kontrolle, n.s. steht für ein nicht signifikantes Verhältnis zur jeweiligen Kontrolle. (n=3 (A); n=4 (B) \pm SEM; $p \leq 0,05$)

4.2 DIE PHOSPHATIDYLSERIN-EXTERNALISIERUNG IST EIN ESSENZIELLER MECHANISMUS ZUR AKTIVIERUNG VON ADAM17

Die bisherigen Ergebnisse zeigten, dass ANO6 durch einen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration aktiviert wird und daraufhin PS externalisiert. Diese Externalisierung führt anschließend zu einer Aktivierung der Shedding-Funktion von ADAM10 und ADAM17. Diese Experimente erfolgten jedoch alle in der Abhängigkeit von Stimulanzen wie IO, Mel und ATP und deren komplexe Signalwege. Um einen eindeutigen Nachweis der Abhängigkeit von ADAM17 und exponiertem PS zu erbringen, war es nötig eine PS-Externalisierung unabhängig von exogenen Stimulanzen und den Einfluss auf ADAM17 zu untersuchen.

Hierbei sollte eine in der Literatur beschriebene natürlich auftretende Punktmutation innerhalb von ANO6 ausgenutzt werden. Diese ANO6-D409G-Mutante wurde bei Untersuchungen zur Aufklärung der Erkennung und Phagozytose von apoptotischen Zellen in murinen B-Lymphozyten entdeckt (Segawa u. a., 2012). Weitere Untersuchungen ergaben, dass diese Punktmutation eine höhere Kalziumsensitivität zur Folge hat und ANO6-D409G dadurch bereits unter konstitutiven Bedingungen eine aktive Scrambling-Funktion aufweist (Scudieri u. a., 2015). Diese Zellen sind damit in der Lage unabhängig von einem Stimulus PS zu externalisieren.

Um diese Mutation zu nutzen und damit die essenzielle Funktion von PS für die Aktivität von ADAM17 weiter zu untersuchen, war es nötig eine humane Form dieser Mutante zu erzeugen. Humanes und murines ANO6 weisen eine über 90 %ige Sequenzhomologie auf (Anhang Abbildung 27). Die entsprechende mutierte Asparaginsäure an Position 409 befindet sich innerhalb des humanen ANO6 an Position 408 (Abbildung 14A). Die umgebenden Aminosäuren sind dabei zwischen humanem und murinem ANO6 identisch. Mittels zielgerichteter Mutagenese sollte nun die Mutante ANO6-D408G-eGFP erstellt und anhand ihrer Eigenschaften charakterisiert werden (Abbildung 14B).

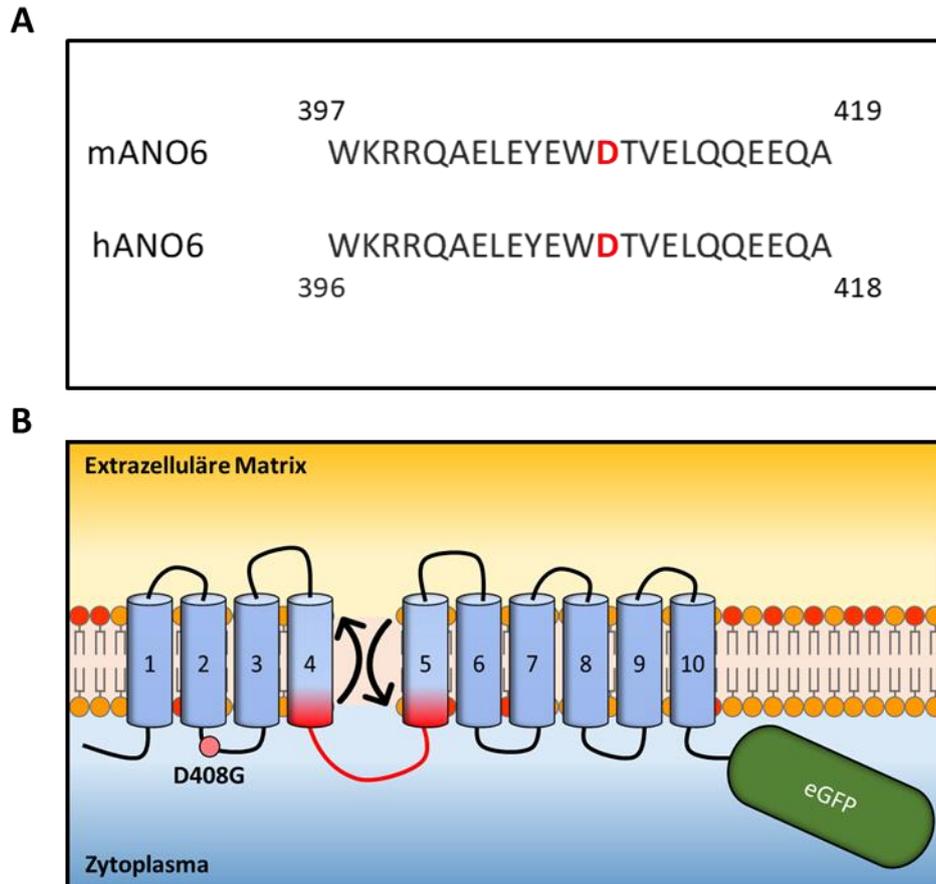


Abbildung 14: Das Anoctamin-6-D408G-Modell. Humanes und murines ANO6 weisen eine Sequenzhomologie von über 90 % auf. Um die in der Literatur beschriebene Mutation von ANO6 D409G auf ein humanes System zu übertragen, muss die entsprechende Asparaginsäure, welche in der humanen Sequenz an Position 408 lokalisiert ist, durch zielgerichtete Mutagenese verändert werden (A). Die erzeugte humane ANO6-D408G-Mutante ist theoretisch durch ihre erhöhte Kalziumsensitivität in der Lage unter konstitutiven Bedingungen PS unabhängig von einem Stimulus zu externalisieren. Schematische Darstellung der ANO6-D408G Mutante und seiner Scrambling-Funktion (B).

4.2.1 GENERIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG DER ANOCTAMIN-6-D408G-eGFP-MUTANTE

Die zielgerichtete Mutagenese von hANO6-eGFP erfolgte wie in Kapitel 3.15.3 beschrieben und die entstandenen Vektoren, ANO6-D408G-eGFP #1, #2, #3, #4 wurden mittels Sanger-Sequenzierung auf ihre korrekte Sequenz überprüft (Anhang Abbildung 28). Die Vektoren wurden anschließend in HEK293T-Zellen transfiziert und auf ihre Eigenschaften untersucht. Dabei zeigte sich, dass die hANO6-Mutante wie auch die entsprechende mANO6-Mutante unter konstitutiven Bedingungen PS externalisieren konnte (Segawa u. a., 2012). Mittels Fluoreszenzmikroskopie wurde exponiertes PS mit Annexin V Alexa Fluor 568 angefärbt und anschließend quantitativ analysiert (Abbildung 15A, B).

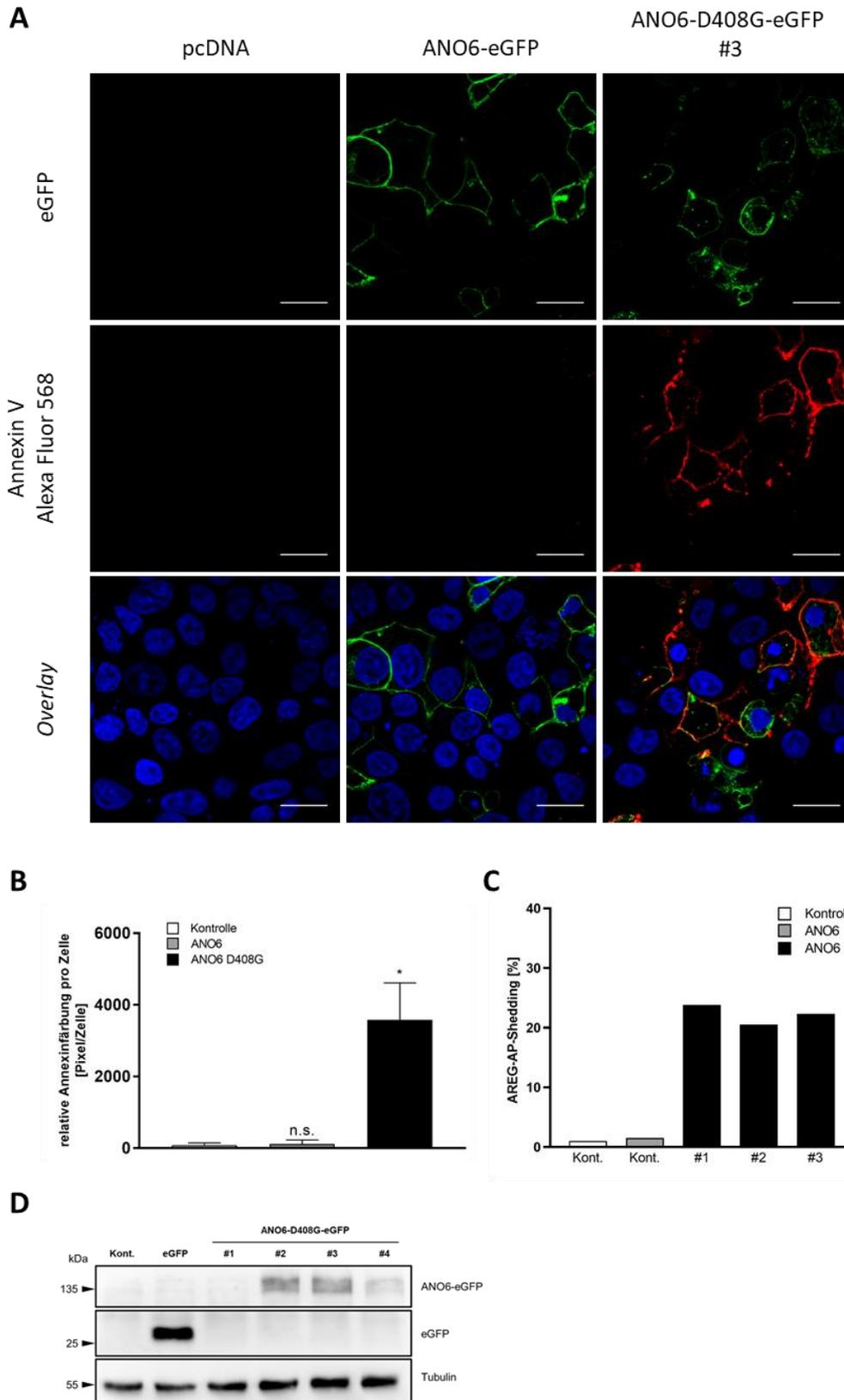


Abbildung 15: Charakterisierung der Anoctamin-6-D408G-Mutante. HEK293T-Zellen wurden mit pcDNA3.1, ANO6-eGFP (grün) oder ANO6-D408G-eGFP #1, #2, #3, #4 (grün) transfiziert (24 h). Die Zellen wurden unstimuliert mit Annexin V Alexa Fluor 568 (rot) angefärbt und fixiert (A). Eine Quantifizierung der PS-Externalisierung erfolgte anhand der Stärke der Fluoreszenzintensität von Annexin V gegenüber der Zellzahl, welche mit Hilfe des Nukleinsäure-Farbstoffs Hoechst 33342 (blau) bestimmt wurde (B). HEK293T-Zellen wurden mit pcDNA3.1, ANO6-eGFP oder ANO6-D408G-eGFP #1, #2, #3, #4 und AREG-AP transfiziert (24 h) und nach

einem Medienwechsel wurden die Zellen nach 30 min auf ihre AP-Aktivität untersucht. Die Aktivität, der in den Überstand freigesetzten AP wurde im Verhältnis zur Summe der Aktivität aus dem Überstand und dem Zelllysat dargestellt (Shedding [%]) (C). Eine Kontrolle der Transfektion und eines entsprechenden Exprimierens von eGFP und ANO6-D408G-eGFP erfolgte mittels *Western Blot* (D). Als Ladekontrolle diente Tubulin. Die dargestellten Aufnahmen sind repräsentativ für vier unabhängige Experimente. Der Maßstab entspricht 20 μm . Die Daten wurden mittels ANOVA und des Post-Hoc-Tests nach Bonferroni analysiert. *steht für einen signifikanten Anstieg in Bezug zur jeweiligen unbehandelten Kontrolle, § steht für einen signifikanten Anstieg gegenüber der pcDNA3.1-transfizierten Kontrolle. (n=4 (B); n=1 (C); \pm SEM; $p \leq 0,05$)

Dabei wiesen Zellen mit ANO6-D408G in Abwesenheit von einem Stimulus signifikant mehr PS-Externalisierung als ANO6-eGFP- und pcDNA3.1-transfizierte Zellen auf. Neben der visuellen Prüfung der Expression von ANO6-eGFP und ANO6-D408G-eGFP mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie wurde auch eine Analyse mittels *Western Blot* durchgeführt. Dabei konnte die Expression von ANO6-D408G #1 in HEK293T-Zellen nicht nachgewiesen werden (Abbildung 15D). Aufgrund dessen erfolgten die weiteren Arbeiten nur mit den Vektoren ANO6-D408G #2, #3 und #4, welche lediglich verschiedene Klone einer Plasmidpräparation darstellen und ansonsten identisch sind. Ein erster Vorversuch, um den Einfluss dieser ANO6-Mutante auf die Shedding-Aktivität der ADAMs zu beurteilen, zeigte, dass der Anteil an freigesetztem AREG-AP in Zellen mit ANO6-D408G ohne Zugabe eines Stimulus deutlich erhöht gegenüber der entsprechenden Kontrolle war (Abbildung 15C).

4.2.2 ANOCTAMIN-6-D408G VERSTÄRKT DAS ADAM-VERMITTELTE SHEDDING UNABHÄNGIG VON STIMULANZIEN

ANO6-D408G wies unter konstitutiven Bedingungen unabhängig von einem Stimulus eine signifikant höhere PS-Externalisierung im Vergleich zu ANO6 auf. In Folge dessen und in Bezug auf die essenzielle Bedeutung von exponiertem PS für die Aktivität von ADAM17 wurde anschließend getestet, ob diese Mutante auch das Shedding von AREG-AP und TGF-alpha-AP reguliert. HEK293T-Zellen wurden hierfür mit eGFP, ANO6-eGFP oder ANO6-D408G-eGFP und einem der beiden Substrate transfiziert. Nach 24 h Transfektionsdauer wurde das Zellkulturmedium durch DMEM ersetzt und die Zellen über einen Zeitraum von 30 min, 60 min oder 90 min in diesem Medium kultiviert. Dabei wiesen die ANO6-D408G-eGFP-transfizierten Zellen im Gegensatz zu den Kontrollen einen signifikanten Anstieg an freigesetztem AREG und TGF-alpha auf (Abbildung 16A, B). Mit Hilfe der Inhibitoren GI, GW und MM wurde wiederum die Beteiligung der für die Freisetzung verantwortlichen Proteasen analysiert. Dabei wurde AREG zu nahezu gleichen Anteilen von ADAM10 und ADAM17 freigesetzt (Abbildung 16C).

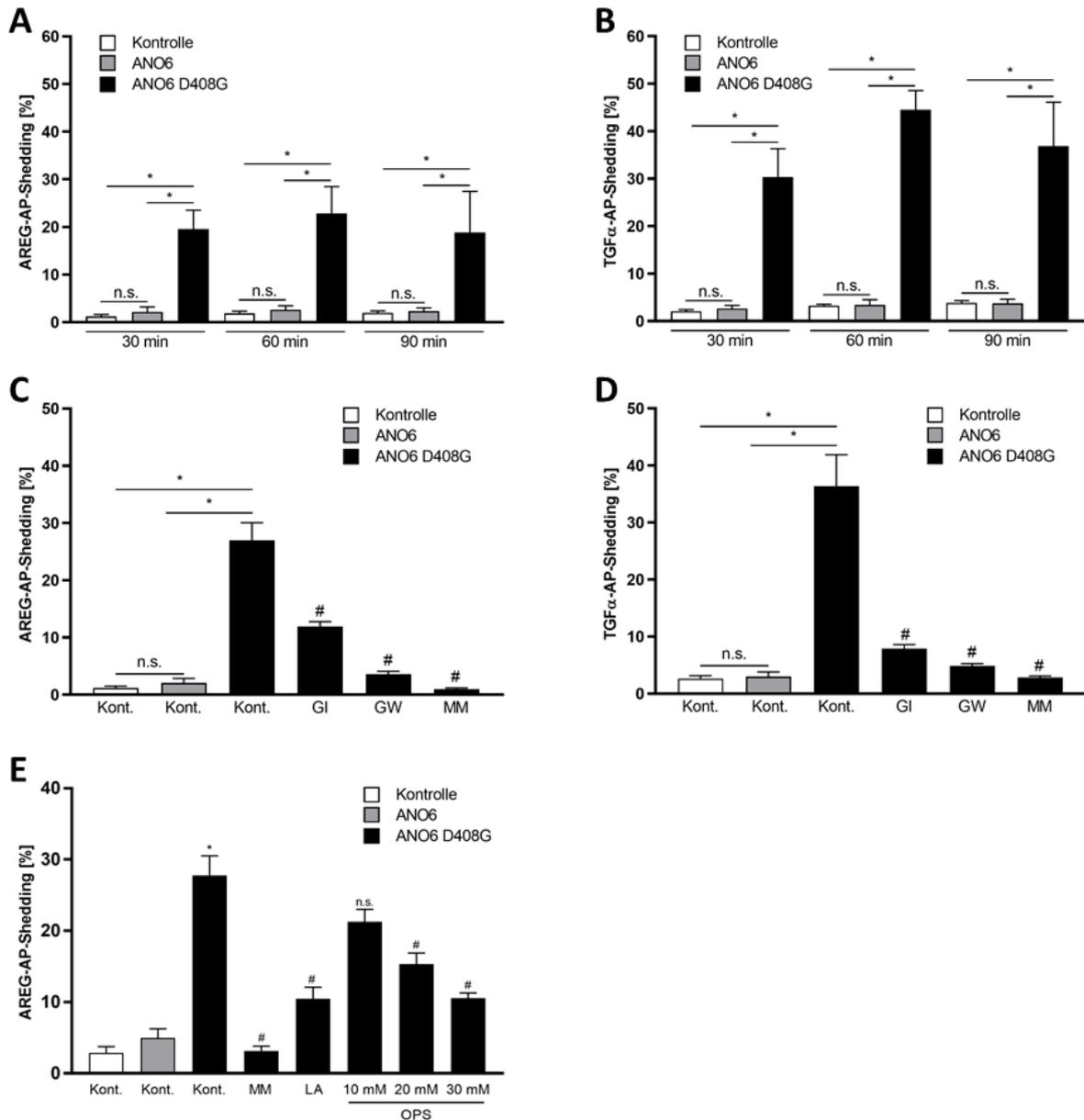


Abbildung 16: Die konstitutiv aktive Mutante Anoctamin-6 D408G erhöht die Freisetzung von AREG- und TGF-alpha. HEK293T-Zellen wurden mit eGFP, ANO6-eGFP oder ANO6-D408G-eGFP und jeweils einem der Substrate AREG-AP oder TGF-alpha-AP transfiziert (24 h). Die Inkubation mit den Inhibitoren GI (3 μM), GW (3 μM), MM (10 μM), OPS (10 – 30 mM) und LA (2 μM) erfolgte für 15 min vor einer Kultivierung für weitere 30 min (C, D, E). Die Aktivität, der in den Überstand freigesetzten AP wurde im Verhältnis zur Summe der Aktivität aus dem Überstand und dem Zelllysat dargestellt (Shedding [%]) (A, B, C, D, E). *steht für einen signifikanten Anstieg in Bezug zur jeweiligen unbehandelten Kontrolle, § steht für einen signifikanten Anstieg gegenüber der eGFP-transfizierten Kontrolle, # steht für eine signifikante Reduktion in Bezug zur jeweiligen stimulierten Kontrolle, n.s. steht für ein nicht signifikantes Verhältnis zur jeweiligen Kontrolle. (n=4 (A, B); n=3 (C, D) ± SEM; p ≤ 0,05)

Das Shedding von TGF-alpha wurde im Gegensatz dazu hauptsächlich durch ADAM10 vermittelt, was durch die starke Hemmung mittels GI deutlich wird (Abbildung 16D). Die Abhängigkeit der Substratfreisetzung von exponiertem PS wurde am Beispiel von AREG-AP mit

Hilfe der Inhibitoren OPS und LA nachgewiesen. Der Einsatz von 2 μM LA hemmte das Shedding von AREG-AP signifikant. Im Vergleich zum LA-Effekt bei der Hemmung des IO-induzierten AREG-Sheddings hätte aufgrund der konstanten PS-Externalisierung der ANO6-Mutante möglicherweise eine höhere Konzentration LA eingesetzt werden müssen um einen stärkeren Effekt zu erzielen. OPS hemmte den Anteil an freigesetztem AREG mit einem konzentrationsabhängigen Effekt, wobei 30 mM OPS den gleichen signifikanten Effekt wie 2 μM LA aufwies (Abbildung 16E).

Sowohl die Ergebnisse der IO-, Mel- und ATP-induzierten ADAM10- und ADAM17-Aktivität in einem Modell mit ANO6-Überexpression als auch die Daten des konstitutiv aktiven ANO6-D408Gs legen eine Beteiligung von ANO6 als Scramblase in der Aktivierung von ADAM10 und ADAM17 nahe. Dieser Mechanismus ist für ANO6 kalziumabhängig und führt zu einer PS-Externalisierung, welche wiederum die Aktivität von ADAM10 und ADAM17 reguliert. Die Ergebnisse der ANO6-D408G-Mutante und der Inhibition mittels OPS und LA zeigen, dass die Aktivierung dieser ADAMs abhängig von exponiertem PS und auch nachweisbar ohne Stimulus induzierbar ist. Weiterhin musste jedoch geklärt werden, ob der Mechanismus einer PS-abhängigen Aktivierung von ADAM17 auch *in vivo* relevant und in Abhängigkeit des RKGK-Motivs ist. Die Daten des PMA-induzierten Sheddings durch ADAM17 legen nahe, dass es auch einen weiteren Mechanismus unabhängig von ANO6 geben könnte.

4.3 DIE IN VIVO-RELEVANZ DES PHOSPHATIDYLSERIN-BINDENDEN RKGK-MOTIVS VON ADAM17

Die folgenden Experimente basieren auf der mittels in vitro-Daten gewonnenen Erkenntnis, dass ADAM17 durch das polykationische RKGK-Motiv der MPD mit exponiertem PS interagiert und dass dies den essenziellen Mechanismus zur Aktivierung von ADAM17 darstellt (Sommer u. a., 2016a). Unterstützt wurden diese Erkenntnisse durch die bisherigen Ergebnisse, in denen ANO6 mittels seiner Scramblase-Funktion das ADAM17-vermittelte Shedding regulierte.

Um die Bedeutung des RKGK-Motivs genauer zu untersuchen, wurde ein mittels CRISPR-CAS9-Genmodifikation generiertes Mausmodell verwendet (Kapitel 3.9). Durch diese Modifikation wurde das RKGK-Motiv innerhalb der MPD in ein neutral-geladenes GGGG-Motiv geändert. Damit sollte die Protease basierend auf den in vitro-Daten nicht in der Lage sein mit exponiertem PS zu interagieren und Substrate freizusetzen (Abbildung 17). Die katalytische Domäne wurde dabei nicht verändert und sollte weiterhin funktional sein.

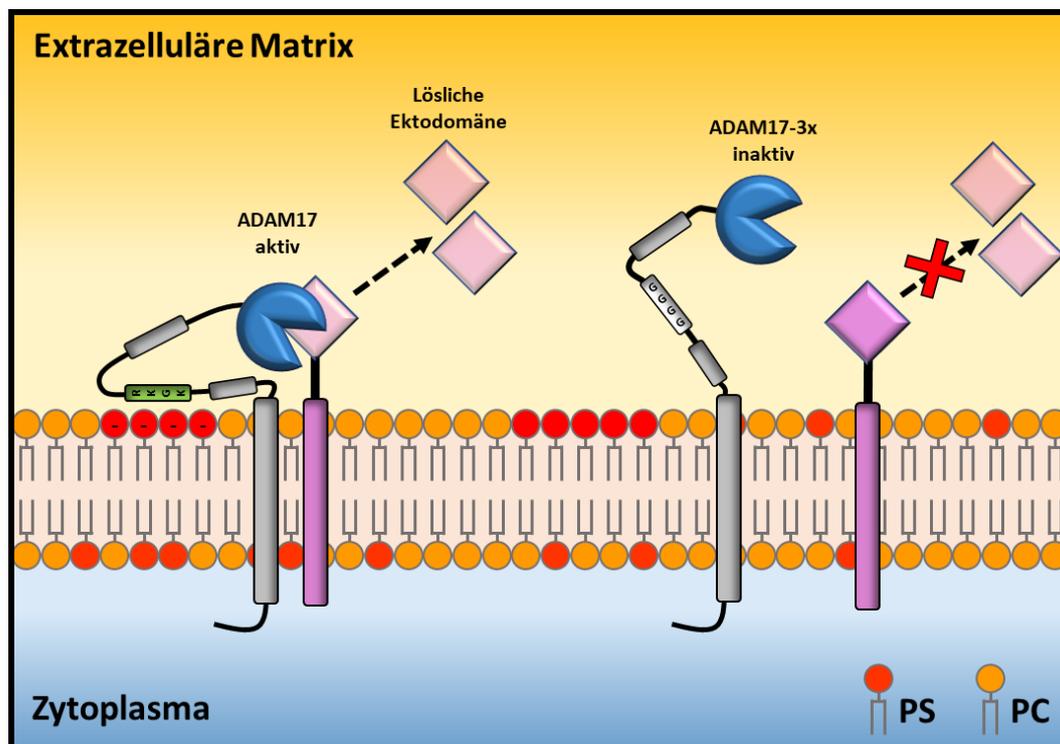


Abbildung 17: Schematische Darstellung des ADAM17-3x Modells. Auf Grundlage von in vitro-Daten zur Untersuchung des Aktivierungsmechanismus von ADAM17 wurde das polykationische RKGK-Motiv innerhalb der MPD (grün) als essenzieller Bestandteil der Interaktion zwischen extrazellulär-exponiertem PS und ADAM17 identifiziert. Nach einer PS-Externalisierung und einer darauffolgenden Interaktion von PS mit der MPD erfolgt das Shedding von einem ADAM17-Substrat. Durch die Mutation des polykationischen Motivs zu einem neutral-geladenen GGGG-Motiv (hellgrau) innerhalb von ADAM17 (ADAM17-3x) kann es zu keiner Wechselwirkung mit exponiertem PS kommen und das Substrat-Shedding tritt nicht auf.

4.3.1 DIE MUTATION DES RKGK-MOTIVS FÜHRT ZU EINER PRÄNATALEN LETALITÄT

Heterozygote ADAM17-3x-Mäuse wurden nach der Generierung des Modells von der Firma Taconic Biosciences (DE) importiert und durch die Zentrale Tierhaltung des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein gehalten und verpaart. Die Mäuse wurden anhand von Schwanzspitzen-Biopsien nach dem Absetzen mittels PCR und einem Restriktionsverdau mit *PpuMI* genotypisiert (Kapitel 3.9.1). Dabei stellte sich heraus, dass keine homozygoten ADAM17^{3x/3x}-Mäuse geboren wurden (Tabelle 15). Diese Beobachtung steht im Einklang mit anderen ADAM17-Mausmodellen, in denen ein funktioneller ADAM17-*Knock-Out* generiert wurde (Canault u. a., 2010; Horiuchi u. a., 2007b; Peschon u. a., 1998). In diesen Modellen gab es mitunter einzelne lebende Tiere mit ADAM17-Defizienz, jedoch starben diese innerhalb weniger Tage nach der Geburt und der größte Anteil der ADAM17-defizienten Tiere starb pränatal. Unterschiede innerhalb der Todeszeitpunkte der Embryonen können möglicherweise auf eine Variation im genetischen Hintergrund der Tiere zurückgeführt werden (Gelling u. a., 2008).

Mit Hilfe von Terminverpaarungen war es möglich tragende Tiere zu einem bestimmten Zeitpunkt zu erhalten. Diese wurden an den Tagen E14, E16 und E18 getötet und deren Embryonen isoliert. Eine entsprechende Genotypisierung dieser Embryonen ergab, dass an E16 und E18 ebenfalls keine lebenden homozygoten ADAM17^{3x/3x}-Tiere existieren. Am E14 konnten lebende Embryonen aller Genotypen, welche im Verhältnis der 2. Regel nach Mendel entsprechen, isoliert werden (Pearson, 1904).

Tabelle 15: Verteilung der Genotypen zu verschiedenen Zeitpunkten.

	Total	ADAM17 ^{WT/WT}	ADAM17 ^{WT/3x}	ADAM17 ^{3x/3x}
postnatal	541	207	334	0
~ E18	31	8	22	(1)
~ E16	16	3	11	(2)
~ E14	314	77 (4)	148 (8)	67 (10)

* (x) steht für die Anzahl an Embryonen, bei denen kein Herzschlag nachgewiesen werden konnte

Die Viabilität der Embryonen wurde anhand eines vorhandenen Herzschlages bestimmt und die Genotypisierung wurde sowohl anhand einer PCR mit anschließendem Restriktionsverdau als auch einer DNA-Sequenzierung nach Sanger überprüft (Abbildung 18A; Anhang Abbildung 29).

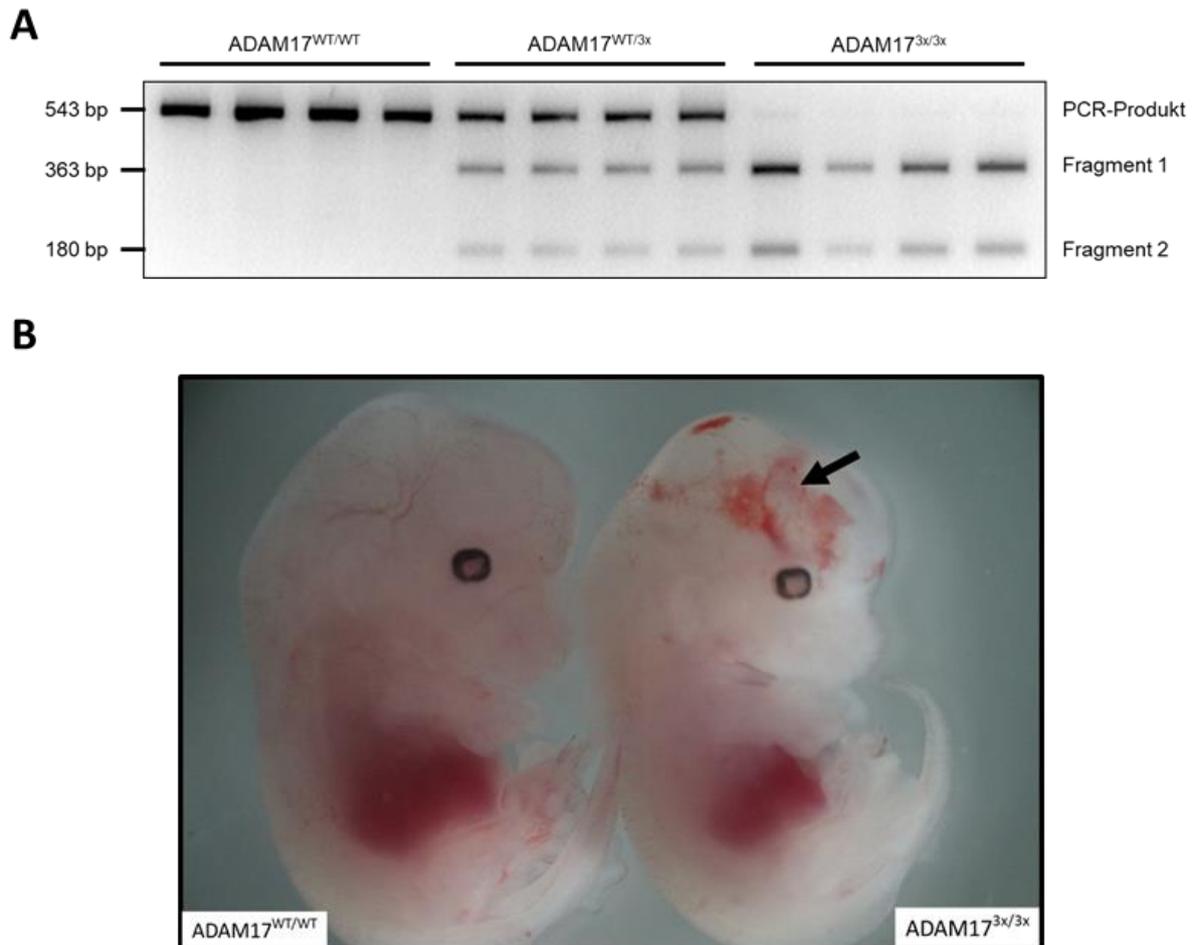


Abbildung 18: Phänotyp und Genotyp von ADAM17-3x-Embryonen am E14. Die Genotypisierung der Embryonen erfolgte mittels PCR und anschließendem Restriktionsverdau der Produkte mit *Pvu*MI für 48 h. Im Anschluss wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese das Produkt (543 bp) und die entstandenen Fragmente (363 bp und 180 bp) aufgetrennt und analysiert. Dargestellt sind repräsentativ Proben aus jeweils vier verschiedenen Tieren pro Genotyp (A). Die isolierten Embryonen wurden mit Hilfe eines Stereomikroskops untersucht und repräsentative Bilder wurden mit 4x Vergrößerung aufgenommen (B). Etwa 50 % der homozygoten ADAM17^{3x/3x}-Embryonen wiesen im Kopfbereich innerliche hämorrhagische Läsionen auf (schwarzer Pfeil).

Im Phänotyp unterschieden sich die Genotypen nur gering. ADAM17^{3x/3x}-Embryonen waren augenscheinlich geringfügig kleiner als deren WT-Pendants. Etwa die Hälfte der ADAM17^{3x/3x}-Embryonen wies eine hämorrhagische Läsion im Kopfbereich auf (Abbildung 18B).

4.3.2 DIE ADAM17-EXPRESSION UND ZELLOBERFLÄCHENLOKALISATION IST UNVERÄNDERT

ADAM17^{3x/3x}-Embryonen sterben zwischen E14 und E16. Um die Ursache des Phänotyps zu untersuchen, stellte sich die Frage, ob diese auf eine fehlende ADAM17-Funktionalität zurückzuführen ist. Zuerst musste jedoch geklärt werden, ob Unterschiede in der Reifung und Expression von ADAM17 zwischen den unterschiedlichen Genotypen auftreten. Dazu wurden zuerst verschiedene Organe der ADAM17-3x-Embryonen am E14 isoliert und auf die Expression der Pro- und gereiften Form von ADAM17 hin analysiert. Lediglich die Leber und der Kopfbereich dieser Embryonen konnte aufgrund des nötigen Materialvolumens mittels *Western Blot* untersucht werden (Abbildung 19A, B). Dabei zeigte sich, dass zwischen den verschiedenen Genotypen eine vergleichbare Ausprägung der Pro- oder gereiften Form von ADAM17 vorlag.

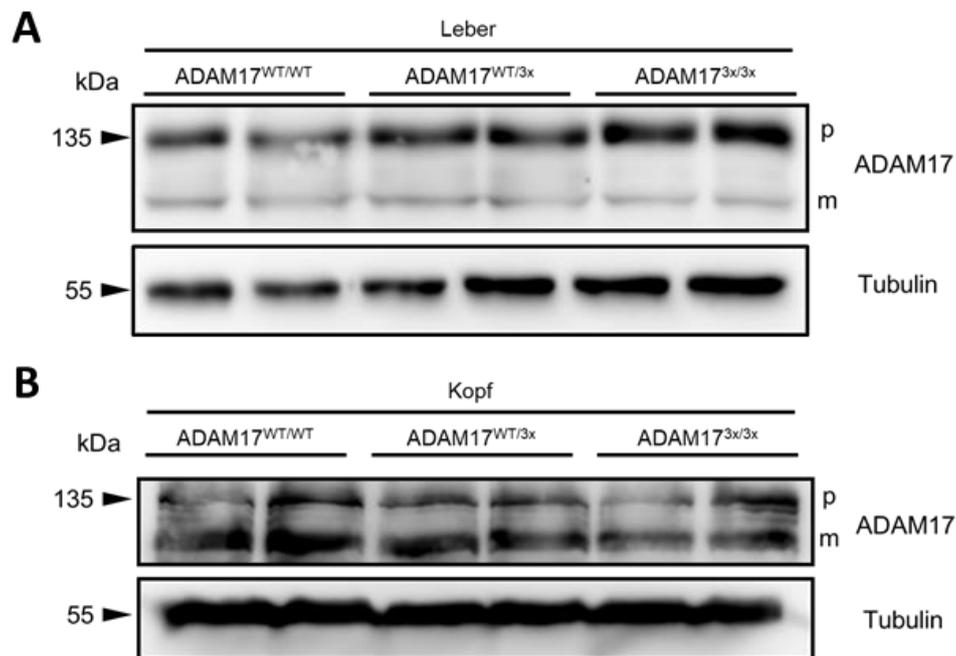


Abbildung 19: ADAM17 Expression verschiedener Organe. Leber (A) und Kopf (B) der ADAM17-3x-Embryonen wurden am E14 isoliert, entsprechend aufgearbeitet und mittels *Western Blot* analysiert. Die Expression der Pro- (p) und gereiften (m; *mature*) Form von ADAM17 wurde detektiert. Als Ladekontrolle diente Tubulin. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen von Proben aus jeweils 2 verschiedener Tiere pro Genotyp.

Für weitere Untersuchungen wurden MEF- und MEH-Zelllinien aus Embryonen am E14 isoliert und deren ADAM17-Expression analysiert. Auch hier gab es eine vergleichbare Expression zwischen den verschiedenen Genotypen in Bezug auf die Pro- und gereifte Form (Abbildung 20A, B). Da der Prozess des Substrat-Sheddings durch ADAM17 auf der Zellmembranoberfläche stattfindet, war es nötig die Lokalisation der Protease zu überprüfen. Mit Hilfe einer Oberflächenbiotinylierung von MEH wurde eine Fraktionierung der Proteine

durchgeführt und anschließend mittels *Western Blot* untersucht (Abbildung 20C). Als Kontrollen für eine korrekte Fraktionierung dienten der EGFR und AKT. EGFR ist ein klassisches Oberflächenprotein und AKT ein zytosolisches Protein.

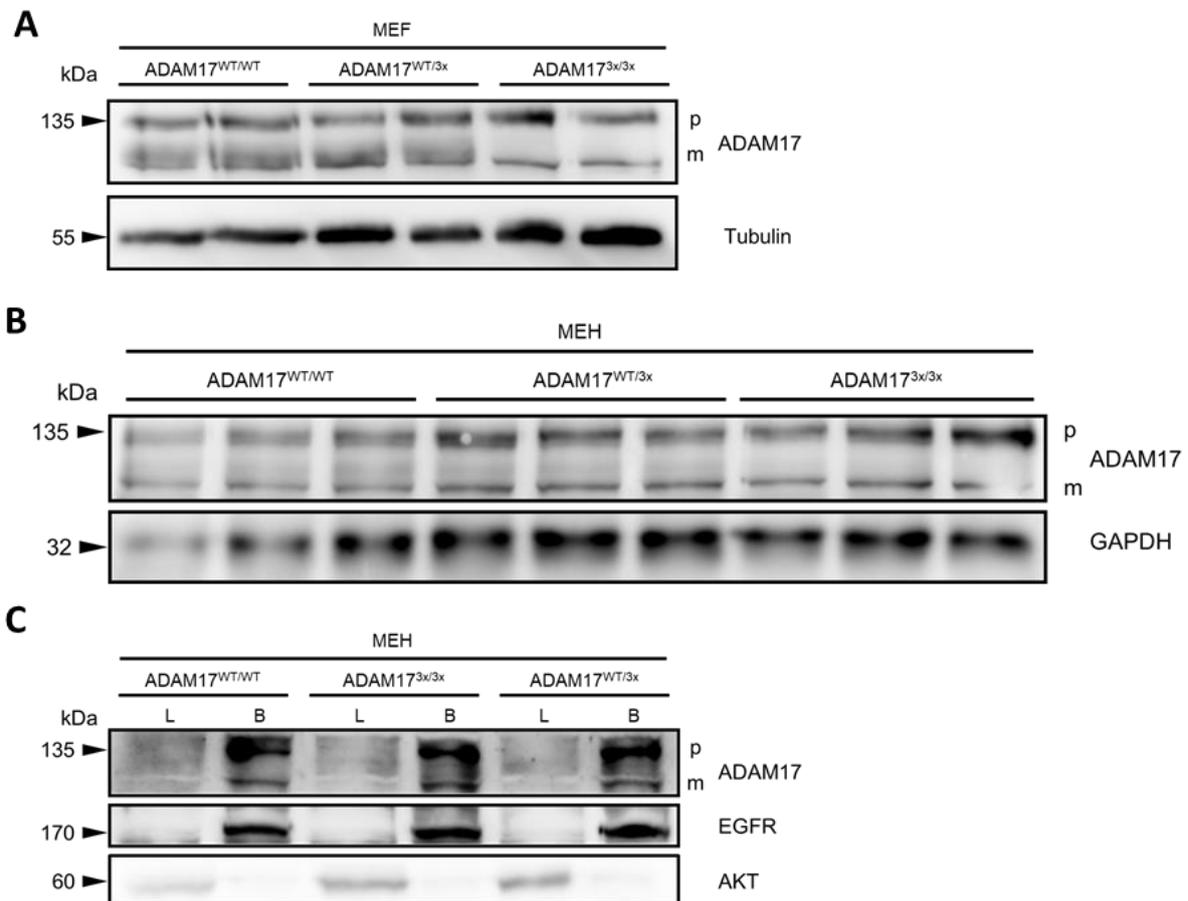


Abbildung 20: ADAM17-Expression in kultivierten ADAM17-3x-Zelllinien. MEF- (A) und MEH-Zellen (B, C) wurden aus ADAM17-3x-Embryonen am E14 isoliert und entsprechend kultiviert. Eine Analyse der ADAM17-Expression erfolgte mittels *Western Blot*. Die Expression der Pro- (p) und gereiften (m; *mature*) Form von ADAM17 wurde detektiert. Als Ladekontrollen dienten Tubulin und GAPDH. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen von Proben aus mindestens zwei verschiedenen Tieren pro Genotyp. Um die Lokalisation von ADAM17 zu untersuchen wurde eine Oberflächenbiotinylierung von MEH-Zellen und anschließender Analyse mittels *Western Blot* durchgeführt (C). Es wurden sowohl das Gesamtzelllysat (L) als auch die biotinylierte Fraktion (B) aufgetragen. Hierbei diente der EGFR als Kontrolle für Zellmembranproteine und AKT als Kontrolle für zytosolisch lokalisierte Proteine.

Die Oberflächenbiotinylierung der MEH-Zellen zeigte keine Unterschiede in der ADAM17-Expression zwischen den verschiedenen Genotypen der ADAM17-3x-Mäuse. Es konnte sowohl die Pro- als auch die gereifte Form von ADAM17 auf der Zellmembranoberfläche nachgewiesen werden. Dadurch wird deutlich, dass die Mutation des RKGK-Motivs keine Auswirkung auf die Expression, Reifung und Oberflächenlokalisierung von ADAM17 in verschiedenen Geweben oder Zelllinien, insbesondere MEH-Zellen, hat.

4.3.3 DIE ADAM10-EXPRESSION IST UNVERÄNDERT

Die ADAM17-Expression und -Lokalisation ist im ADAM17-3x-Modell unabhängig von der Mutation des RKGK-Motivs und dies konnte durch die Proteinexpressionsanalyse gezeigt werden. Wie jedoch bereits in den Experimenten der ANO6-vermittelten Regulation von ADAM10 und ADAM17 deutlich wurde, teilen diese beiden Proteasen ein gewisses Substratspektrum und sind beide in der Lage diese freizusetzen (Folgoša u. a., 2013). In der Literatur wurde bereits gezeigt, dass bei einer Defizienz von ADAM17 ein kompensatorischer Effekt durch ADAM10 eintritt, bei dem ADAM10 die Substratfreisetzung übernimmt (Le Gall u. a., 2009).

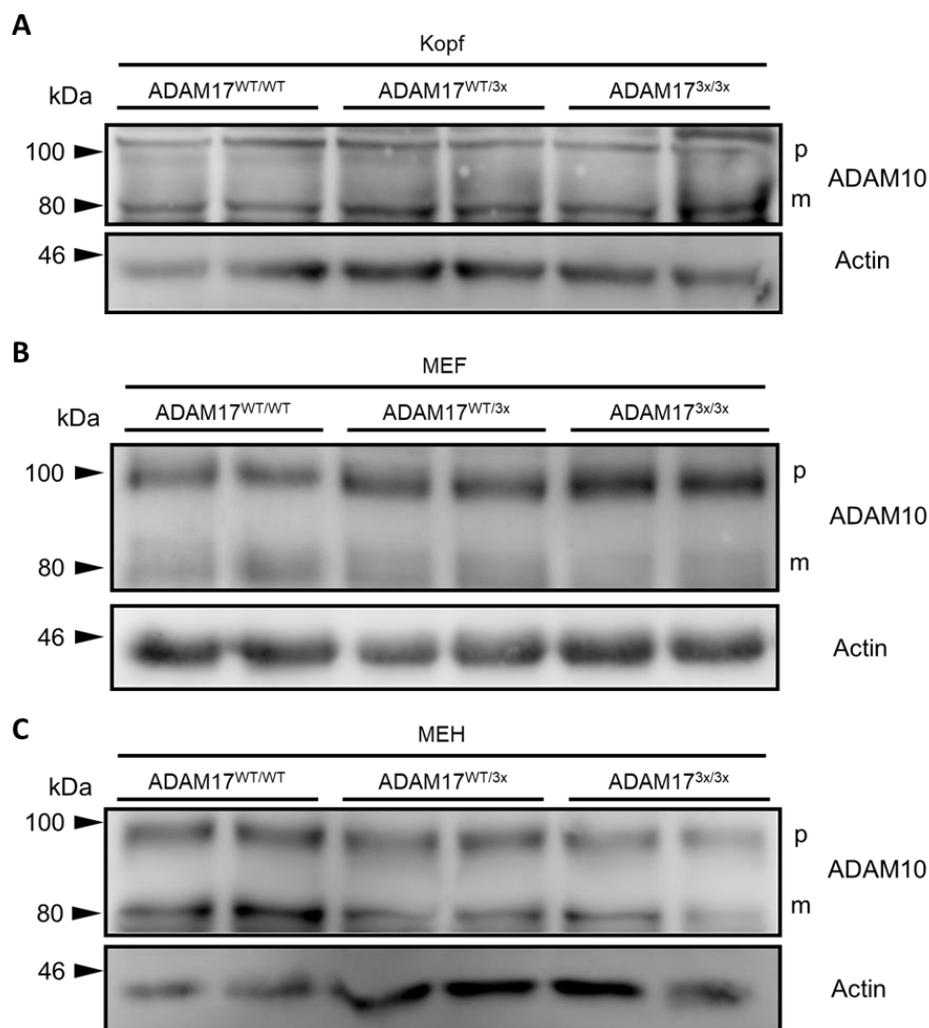


Abbildung 21: ADAM10-Expression in verschiedenen Geweben und Zelllinien von ADAM17-3x-Mäusen. Dargestellt ist die Expression von ADAM10 im Kopfgewebe von ADAM17-3x Embryonen am E14 und den kultivierten Zelllinien MEH und MEF mittels *Western Blot*. Die Abbildungen stehen repräsentativ für jeweils drei unabhängige Experimente. P steht für die Proform von ADAM10; m steht für die gereifte (*mature*) Form von ADAM10. Als Ladekontrolle diente Actin.

Um solch einen Effekt auszuschließen wurde auch eine Proteinexpressionsanalyse für ADAM10 in verschiedenen Geweben und Zellen der ADAM17-3x-Mäuse durchgeführt. Dadurch sollte geklärt werden, ob es basierend auf einem möglichen kompensatorischen Effekt zu einer verstärkten Expression von ADAM10 in ADAM17^{3x/3x}-Embryonen kommt. Die Expression von ADAM10 im Kopfgewebe der Embryonen zeigte keinen Unterschied zwischen den verschiedenen Genotypen (Abbildung 21A). Auch die Proben der isolierten MEF- und MEH-Zelllinien wiesen eine vergleichbare Expression der Pro- und gereiften Form von ADAM10 auf (Abbildung 21B, C). Als Ladekontrolle dieser Expressionsanalysen diente Actin.

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die Expression von ADAM10 innerhalb verschiedener Genotypen unverändert ist, und sind somit ein erstes Indiz, dass kein kompensatorischer Effekt auftritt. Ein solcher Effekt kann jedoch nur eindeutig mittels einer funktionalen Analyse der ADAM10-Aktivität vollkommen ausgeschlossen werden.

4.3.4 DIE INTERAKTION VON PHOSPHATIDYLSERIN UND DEM RKGK-MOTIV IST ESSENZIELL FÜR DIE SHEDDING-AKTIVITÄT VON ADAM17

Die bisherig erlangten Ergebnisse verdeutlichen, dass eine Mutation des RKGK-Motivs keine Auswirkung auf die Expression von ADAM17 hat. Um den drastischen Phänotyp der ADAM17^{3x/3x}-Embryonen auf die fehlende Interaktion zwischen PS und dem mutierten RKGK-Motiv zurückzuführen, musste eine funktionale Analyse von ADAM17 durchgeführt werden. Für eine solche Untersuchung wurden mehrere Faktoren berücksichtigt. Zum einen war es notwendig einen Stimulus zu wählen, der nur ADAM17 aktiviert. Diesbezüglich wurde eine PMA-Stimulation gewählt, welche die klassische Methode, um ADAM17 zu aktivieren, darstellt (Le Gall u. a., 2009; Lorenzen u. a., 2016; Marezky u. a., 2013). Zum anderen musste zuerst nachgewiesen werden, dass eine PMA-Stimulation zu einer PS-Externalisierung innerhalb des gewählten Zellsystems führt.

Als System der Wahl dienten ADAM17-3x-MEH-Zellen, weil diese in größerer Menge aus Embryonen am E14 isoliert werden konnten und gute Wachstumseigenschaften in der Kultivierung aufwiesen. Weiterhin konnte bereits in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass ADAM17 auf der Zellmembranoberfläche von MEH in gleicher Ausprägung zwischen den Genotypen vorliegt. In der Literatur ist die ADAM17-Aktivität in adulten Hepatozyten hinreichend beschrieben (McMahan u. a., 2013).

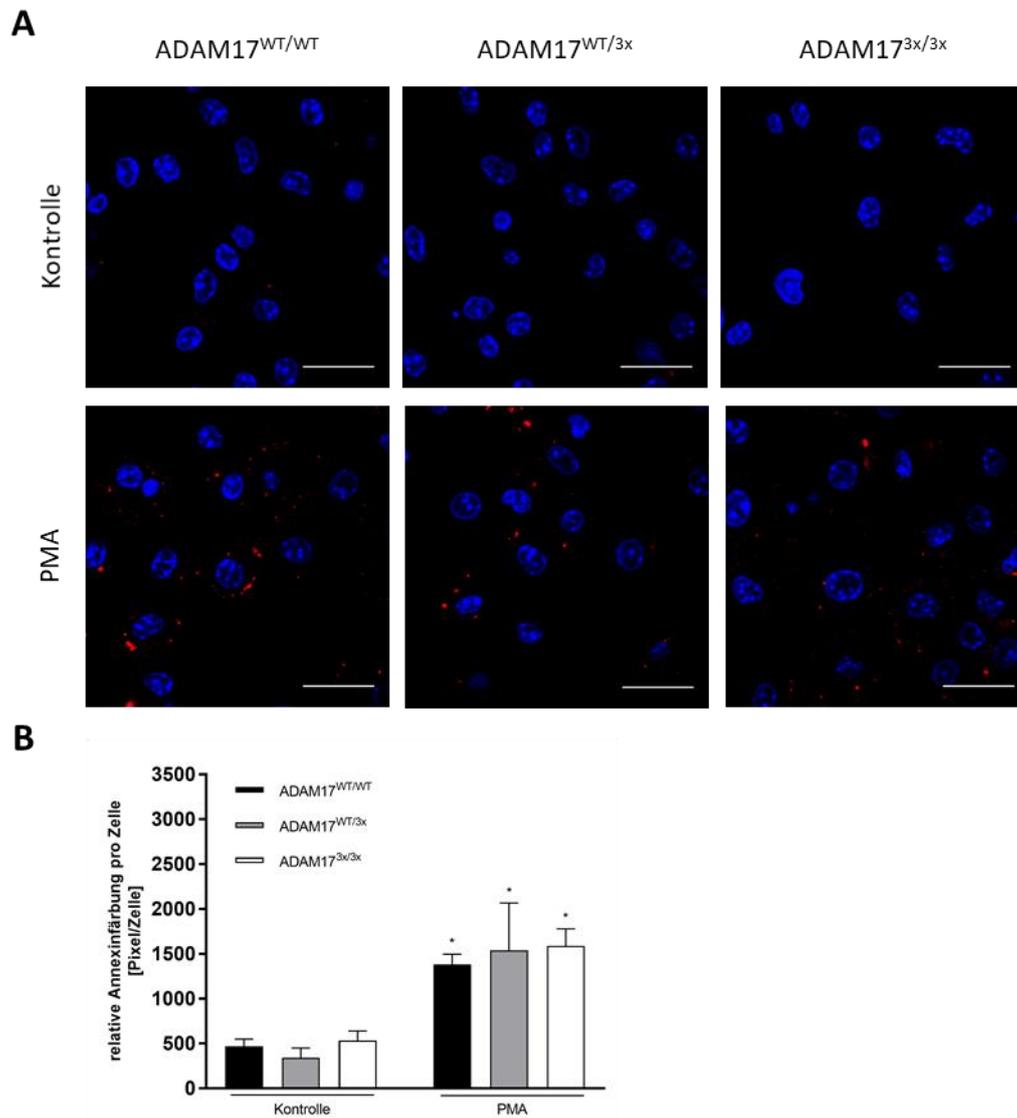


Abbildung 22: PMA-Stimulation führt zu einer Phosphatidylserin-Externalisierung in MEH. MEH-Zellen aller Genotypen wurden 72 h nach ihrer Isolation mit 200 ng/ml PMA für 30 min inkubiert. Nach der Stimulation wurden die Zellen mit Annexin V Alexa Fluor 568 (rot) angefärbt und fixiert (A). Eine Quantifizierung der PS-Externalisierung erfolgte anhand der Stärke der Fluoreszenzintensität von Annexin V gegenüber der Zellzahl, welche mit Hilfe des Nukleinsäure-Farbstoffs Hoechst 33342 (blau) bestimmt wurde (B). Die dargestellten Aufnahmen sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente. Der Maßstab entspricht 20 µm. Die Daten wurden mittels ANOVA und des Post-Hoc-Tests nach Bonferroni analysiert. *steht für einen signifikanten Anstieg in Bezug zur jeweiligen unbehandelten Kontrolle. (n=5; ± SEM; p ≤ 0,05)

Für einen Nachweis der PS-Externalisierung in MEH-Zellen wurden diese 72 h nach der Isolation für 30 min mit 200 ng/ml PMA inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine Färbung des exponierten PS mit Annexin V Alexa Fluor 568 und einer anschließenden Fixierung der Zellen (Abbildung 22A). Mittels Fluoreszenzmikroskopie wurde die Fluoreszenzintensität des gebundenen Annexin V quantitativ ausgewertet (Abbildung 22B). Dabei zeigten MEH-Zellen aller Genotypen einen signifikanten Anstieg in der Menge des exponierten PS nach einer PMA-Stimulation im Vergleich zu ihrer unbehandelten Kontrolle. Die Menge an externalisiertem PS

nach der Inkubation wies keine signifikanten Unterschiede zwischen den jeweiligen Genotypen auf (nicht dargestellt).

Anhand dieser Ausgangsvoraussetzungen konnte der Einfluss einer PMA-Stimulation auf die ADAM17-Aktivität in MEH untersucht werden. Diese Aktivität sollte anhand des ADAM17-Sheddings von endogenen Substraten untersucht werden. Es wurden daraufhin mehrere Substrate, u.a. IL-6R, AREG und TGF-alpha, auf ihre Expression mittels ELISA untersucht. Diese Substrate waren in ihren Mengen unterhalb des Detektionsminimums und konnten somit nicht für die folgenden Experimente genutzt werden (nicht dargestellt). Ein vielversprechendes ADAM17-Substrat war TNFR1, welches auch bereits in der Literatur für Hepatozyten beschrieben wurde (Murthy u. a., 2010).

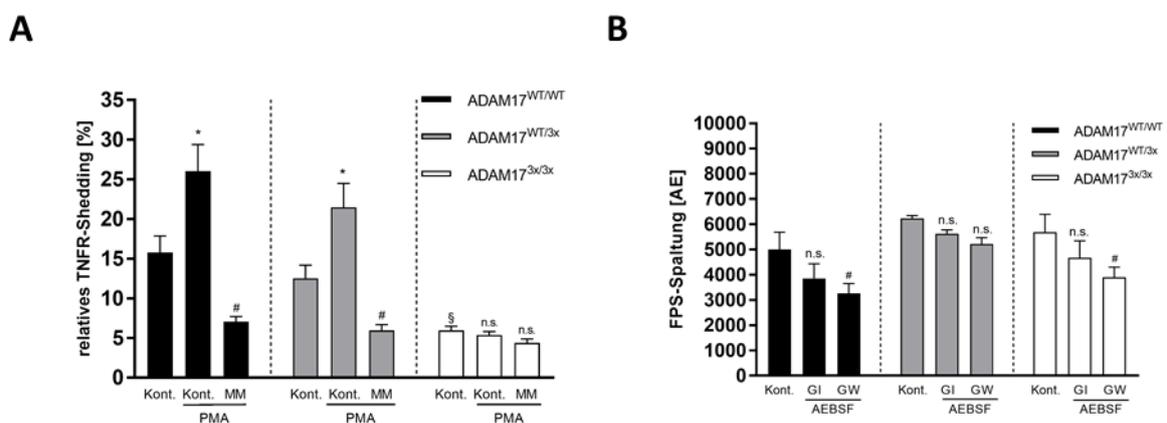


Abbildung 23: TNFR1-Shedding und Spaltung des löslichen fluorogenen ADAM17-Substrats in MEH. MEH-Zellen wurden 72 h nach ihrer Isolation für 2 h mit 200 ng/ml PMA inkubiert. Anschließend wurden der Überstand und das Zelllysat mittels ELISA auf ihren TNFR1-Gehalt überprüft (A). Dargestellt ist das TNFR1-Shedding als Verhältnis des freigesetzten TNFR1 in den Überstand und die Summe des TNFR1 aus Überstand und Lysat [% Shedding]. Die katalytische Funktion von ADAM17 wurde mittels eines löslichen fluorogenen ADAM17-Substrates untersucht. MEH wurden ebenfalls 72 h nach ihrer Isolation in An- oder Abwesenheit der Inhibitoren GI (3 μ M), GW (3 μ M) und AEBFS (100 μ M) für 2 h mit 5 μ M FPS inkubiert. Die Inhibitoren wurden 15 min vor der Stimulation inkubiert. Die Spaltung des Substrates wurde mittels Fluoreszenzdetektion ermittelt [AE] (B). Die Daten wurden mittels ANOVA und des Post-Hoc-Tests nach Bonferroni analysiert. *steht für einen signifikanten Anstieg in Bezug zur jeweiligen unbehandelten Kontrolle, § steht für eine signifikante Reduktion gegenüber der Kontrolle anderer Genotypen, # steht für eine signifikante Reduktion in Bezug zur jeweiligen stimulierten Kontrolle, n.s. steht für ein nicht signifikantes Verhältnis zur jeweiligen Kontrolle. (n=7 (A); n=3 (B) \pm SEM; $p \leq 0,05$)

Für die Untersuchung des TNFR1-Sheddings in MEH wurden diese 72 h nach ihrer Isolation für 2 h mit 200 ng/ml PMA in An- oder Abwesenheit von 10 μ M MM inkubiert. Das freigesetzte Substrat wurde im Verhältnis zum gesamten TNFR1-Gehalt der Zellen ermittelt. Dabei zeigten ADAM17^{3x/3x}-MEH bereits unter konstitutiven Bedingungen ein signifikant reduziertes TNFR1-Shedding in Bezug zu den anderen Genotypen. Eine PMA-Stimulation führte in MEH von

ADAM17^{WT/WT} und ADAM17^{WT/3x} zu einem signifikanten Anstieg an freigesetztem TNFR1, welcher wiederum mittels MM gehemmt werden konnte. Da eine PMA-Stimulation nur zu einer Aktivierung von ADAM17 führt, steht dieses Shedding somit im Zusammenhang mit der Aktivität von ADAM17. Die PMA-Stimulation der ADAM17^{3x/3x}-MEH hatte keinen Einfluss auf die Freisetzung von TNFR1 (Abbildung 23A). Anhand dieser Daten wurde deutlich, dass eine Mutation des RKGK-Motivs zu einer signifikanten Reduktion der ADAM17-Aktivität führte. Des Weiteren war dieser Einfluss bereits unter konstitutiven Bedingungen nachweisbar.

Um einen möglichen Einfluss der Mutation auf die katalytische Aktivität von ADAM17 auszuschließen, wurden MEH mit einem löslichen fluorogenen Substrat inkubiert. Dieses Substrat ist ein fluorogenes Peptid, welches die Schnittstelle von TNF-alpha enthält und nach einer Spaltung durch ADAMs ein nachweisbares Fluoreszenzsignal emittiert (Moss und Rasmussen, 2007). Um die Beteiligung von ADAM10 und ADAM17 in dieser Spaltung zu beurteilen wurden die Zellen vor Beginn der Stimulation für 15 min mit GI und GW inkubiert. Zusätzlich wurden alle Proben mit dem Inhibitor AEBSF versetzt, um einen möglichen unspezifischen Einfluss durch Serinproteasen an der Substratspaltung auszuschließen. Nach einer Inkubation von 2 h mit 5 µM FPS wiesen MEH aller Genotypen eine deutliche Spaltung des Substrates auf (Abbildung 23B). Kontrollen für einen Protease-unabhängigen Zerfall des Peptids über die Zeit wurden durchgeführt und zeigten, dass das Auftreten eines Fluoreszenzsignals nur in Abhängigkeit von proteolytischer Aktivität auftritt (nicht dargestellt). MEH aus ADAM17^{WT/WT}- und ADAM17^{3x/3x}-Embryonen zeigten nach einer Inhibition mittels GW eine signifikante Verringerung des Fluoreszenzsignals des gespaltenen Peptids. ADAM17^{WT/3x}-MEH wiesen nach einer Inkubation mit GI und GW eine tendenziell geringe Spaltung des Substrates, jedoch keinen signifikanten Unterschied auf.

Insgesamt verdeutlichten diese Ergebnisse, dass eine Mutation des RKGK-Motivs keinen Einfluss auf die katalytische Funktion von ADAM17 hatte, jedoch zu einer deutlichen Verminderung des TNFR1-Sheddings in ADAM17^{3x/3x}-Embryonen führte. Anhand der gewonnenen Daten kann eine essenzielle Relevanz des RKGK-Motivs für die Shedding-Aktivität von ADAM17 festgestellt werden.

5 DISKUSSION

Die vielschichtige physiologische und pathologische Bedeutung von ADAM17 reicht von einer essenziellen Funktion innerhalb der normalen Entwicklung des Menschen bis hin zur Assoziation mit der Progression bestimmter Krebsarten, wie z.B. Prostata- oder Brustkrebs. Auf dieser Grundlage ist es von besonderer Bedeutung den molekularen Mechanismus hinter der Aktivierung von ADAM17 aufzuklären und somit möglicherweise den Grundstein für neuartige Therapieansätze zu setzen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Bedeutung der Zellmembran-Asymmetrie, die regulatorische Rolle von Phosphatidylserin und dessen Exposition auf der äußeren Seite der Zellmembran hinsichtlich der Aktivierung von ADAM17 untersucht. Mit einem Fokus auf die kalziumabhängige Scramblase ANO6 wurde hierbei analysiert, inwiefern sich eine verstärkte PS-Externalisierung auf die ADAM17-vermittelte Substratfreisetzung auswirkte. Dabei wurde deutlich, dass eine Überexpression von ANO6 und ein Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration durch Stimulation mit IO, ATP und Melittin nicht nur zu einer verstärkten Shedding-Aktivität von ADAM17, sondern auch von ADAM10 und weiteren unbekanntem Metalloproteasen führte. Weiterhin wurde deutlich, dass eine Stimulation mit dem klassischen ADAM17-Aktivator PMA bei gleichzeitiger Überexpression von ANO6 keinen verstärkten Einfluss auf die ADAM17-vermittelte Substratfreisetzung hatte.

Der erstmalige Einsatz der humanen ANO6-D408G-Mutante und deren einzigartiges Merkmal, bereits unter konstitutiven Bedingungen PS zu externalisieren, konnte die essenzielle Funktion der PS-Exposition innerhalb der ADAM17-Aktivierung verdeutlichen. Bereits durch die Überexpression dieser Mutante konnte in Abwesenheit eines Stimulus ein deutlicher Anstieg von freigesetztem AREG und TGF-alpha nachgewiesen werden.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die in vivo-Relevanz des PS-bindenden RKGK-Motivs analysiert. Die Untersuchungen wurden mit Hilfe des ADAM17-3x-Mausmodells, indem dieses Motiv mittels CRISPR-Cas9 mutiert wurde und infolgedessen es zu keiner Interaktion zwischen der MPD von ADAM17 und PS kommt, durchgeführt. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass die PS-Exposition innerhalb des Aktivierungsmechanismus von ADAM17 in vivo essenziell ist. Die eingebrachte Mutation führte zu einer pränatalen Letalität der ADAM17^{3x/3x}-Embryonen. Des Weiteren wiesen embryonale Hepatozyten eine konstitutiv verminderte und nicht PMA-induzierbare Shedding-Aktivität auf.

5.1 ANOCTAMIN-6 REGULIERT KALZIUMABHÄNGIG DIE ADAM10- UND ADAM17-AKTIVITÄT VIA PHOSPHATIDYLSERIN-EXTERNALISIERUNG

Durch ausführliche strukturelle und funktionelle Untersuchungen ihrer Scrambling-Domäne ist heute nachweislich erbracht, dass ANO6 eine kalziumabhängige Scramblase ist (Bethel und Grabe, 2016; Nguyen u. a., 2011; Schreiber u. a., 2018; Yu u. a., 2015). Durch Untersuchungen von B-Lymphozyten aus Scott-Syndrom-Patienten, welche ein nicht-funktionales ANO6 aufweisen, wurde deutlich, dass die durch IO induzierte und von ADAM17 abhängige Freisetzung von L-Selektin in diesen Zellen beeinträchtigt ist (Sommer u. a., 2016a). In Hinblick auf die essenzielle Funktion von exponiertem PS in der Aktivierung von ADAM17 ergab sich dadurch die Frage, ob ANO6 einen möglichen Mediator in diesem Aktivierungsmechanismus darstellt.

Um diesen Sachverhalt zu untersuchen, wurde ein transientes ANO6-Überexpressionsmodell in HEK293T-Zellen gewählt. Dieses System wurde bereits in Untersuchungen bezüglich der Scrambling-Funktion von ANO6 oder der Ionenkanalfunktion anderer ANO-Familienmitglieder genutzt (Schreiber u. a., 2018; Tian u. a., 2012; Yu u. a., 2015). Dabei sind HEK293T-Zellen auf Grund ihrer guten Transfektionsrate und ihres humanen Hintergrundes ein nützliches Werkzeug. Innerhalb dieser Arbeit konnten die HEK293T-Zellen reproduzierbar mit einer Transfektionsrate um 90 % mit verschiedenen ANO6-Konstrukten transient transfiziert werden und wurden deshalb einem stabil transfizierten System vorgezogen. Des Weiteren konnten so charakteristische Veränderungen des zellulären Systems, die bei einer stabilen Transfektion auftreten können, vermieden werden (Stepanenko und Heng, 2017). Eine sinnvolle Ergänzung eines solchen Überexpressionsmodells wären Untersuchungen mittels eines *Knock-Out*- oder siRNA-transfizierten *Knock-Down*-Modells. Da die ursprüngliche Verbindung von ANO6 und ADAM17 anhand der natürlich auftretenden ANO6-Mutation im Scott-Syndrom, welches dementsprechend im Vergleich zu normalen Lymphozyten einem *Knock-Out*-Modell entsprechen würde, gezogen wurde, wurden Arbeiten mit solchen Modellen aufgrund eines nicht zu erwartenden Mehrwertes nicht durchgeführt.

Innerhalb des ANO6-Überexpressionsmodells wurde ein intrazellulärer Anstieg der Kalziumkonzentration durch die Verwendung von IO oder Mel erzeugt. Dabei waren die verwendeten Konzentrationen von IO (0,5 μM – 1 μM) und Mel (1 μM) im Rahmen des üblich verwendeten (Schreiber u. a., 2018; Sommer u. a., 2012; Tian u. a., 2012) (Abbildung 10, Abbildung 12). Um

eine physiologischere Umgebung zu simulieren, wurden HEK293T-Zellen mit einer Konzentration von 1 mM ATP inkubiert (Abbildung 12). Zusätzlich wurden diese Zellen, die natürlicherweise kaum P2X- und P2Y-Rezeptoren exprimieren, mit dem P2X7-Rezeptor transfiziert (Di Garbo u. a., 2012; Kasuya u. a., 2017). Ohne diesen Rezeptor wiesen HEK293T-Zellen keine veränderte Substratfreisetzung nach einer ATP-Stimulation auf (Abbildung 12C, D). Extrazelluläres ATP wird vor allem in der Kanzerogenese als tumorförderliche Umgebung angesehen und als ein möglicher Marker für Entzündungskrankheiten diskutiert, wobei in vivo extrazelluläre ATP-Konzentrationen bis zu 700 μ M messbar waren (Pellegatti u. a., 2008; Di Virgilio u. a., 2016). Innerhalb von in vitro-Experimenten werden ATP-Konzentrationen bis zu 3 mM verwendet (Morelli u. a., 2003).

Sowohl eine IO- oder Mel-, als auch eine ATP-Stimulation führten in HEK293T-Zellen bei einer ANO6-Überexpression zu einem signifikanten Anstieg an freigesetztem AREG- und TGF-alpha-AP. Die Untersuchung der Shedding-Aktivität der ADAMs erfolgte mit Hilfe von AP-markierten ADAM-Substraten, wobei diese grundlegende Technik vor allem genutzt wird um eine Vielzahl an Substraten, welche möglicherweise nicht endogen exprimiert werden, zu testen (Le Gall u. a., 2009; Maretzky u. a., 2011). Innerhalb dieser Experimente wurde deutlich, dass neben ADAM17 auch ADAM10 und andere unbekannte Metalloproteasen vermehrt an der Prozessierung von TGF-alpha und AREG beteiligt waren. Dadurch kam die Frage auf, ob eine PS-Externalisierung möglicherweise für weitere Proteasen aktivierend wirkt. Innerhalb der Arbeitsgruppe wurde auf Grundlage der strukturellen Ähnlichkeit von ADAM10 und ADAM17 vermutet, dass auch ADAM10 mit exponiertem PS interagieren kann und dass dadurch die Shedding-Aktivität reguliert wird. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen konnten ein polykationisches Motiv in der *stalk*-Region von ADAM10 für diesen Mechanismus ausfindig machen und zeigten ebenfalls, dass die ADAM10-Aktivität in vergleichbarer Art wie die von ADAM17 durch PS-Externalisierung reguliert wird (Bleibaum u. a., 2019).

Vor allem die TGF-alpha-Freisetzung nach einer IO-, Mel- oder ATP-Stimulation und gleichzeitiger ANO6-Überexpression zeigte durch die verhältnismäßig geringe inhibitorische Wirkung von GI und GW im Gegensatz zu MM, dass auch weitere Metalloproteasen an der Substratfreisetzung beteiligt waren (Abbildung 10, Abbildung 12). Es ist bereits bekannt, dass andere ADAM-Mitglieder, z.B. ADAM9 und ADAM15, an der Freisetzung von TGF-alpha beteiligt sein können (Merlos-Suárez u. a., 2001; Schäfer u. a., 2004). Des Weiteren könnte auch eine Freisetzung durch Matrix-Metalloproteasen (MMP), u.a. MMP-9, möglich sein

(Arribas u. a., 1996; Mohan u. a., 2002). Durch den inhibitorischen Effekt von LA, welcher im gleichen Ausmaß wie der von MM ausfiel, wurde deutlich, dass dieser Effekt von exponiertem PS abhängig war. Daraus kann geschlossen werden, dass auch weitere Metalloproteasen über einen ähnlichen Aktivierungsmechanismus wie den von ADAM10 und ADAM17 verfügen könnten.

Des Weiteren stellte sich die Frage, warum vermehrt andere Proteasen, wie u.a. ADAM10 an der Freisetzung von TGF- α und AREG beteiligt waren, obwohl ADAM17 in diesem System funktional aktiv war. Hierbei könnten verschiedene Faktoren eine Rolle spielen. Es ist bereits bekannt, dass ADAM10 und ADAM17 über kompensatorische Mechanismen verfügen, bei denen sie bei einer Defizienz der jeweils anderen Protease die Substratfreisetzung übernehmen können (Le Gall u. a., 2009; Garbers u. a., 2011). Wie durch die Fluoreszenzfärbung von exponiertem PS in ANO6-überexprimierenden HEK293T-Zellen deutlich wurde, führte eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration zu einer verstärkten PS-Externalisierung im Gegensatz zu untransfizierten Zellen (Abbildung 9). Zum einen wäre es möglich, dass die Shedding-Aktivität von ADAM17 bereits unter untransfizierten Bedingungen vollkommen ausgelastet ist und durch die Überexpression von ANO6 und in Folge der vermehrten PS-Exposition ADAM10 zusätzlich zur Freisetzung beiträgt. Zum anderen könnte die supraphysiologische Menge an exponiertem PS zur Auflösung von Nanodomänen der Zellmembran und dadurch zu einem vermehrten Aufeinandertreffen von Substraten und Proteasen, die normalerweise räumlich voneinander getrennt sind, führen. In der Literatur gibt es bereits mehrere Vermutungen die nahelegen, dass u.a. ADAM17 und ADAM10 in einer Nanodomänenstruktur, vermittelt durch z.B. Tetraspanine oder iRhoms, räumlich exakt platziert sind (Arduise u. a., 2008; Gutiérrez-López u. a., 2011; Matthews u. a., 2016; Sommer u. a., 2016b). Dadurch, dass Scramblasen wie ANO6 Phospholipide unspezifisch und bidirektional entlang ihres Konzentrationsgradienten transportieren, muss durch eine vermehrte PS-Externalisierung auch eine verstärkte Internalisierung von Phospholipiden der äußeren Seite der Membran erfolgen. Dies würde wiederum zu einem Verlust der horizontalen Membranstruktur beitragen.

Erstaunlicherweise wurde durch den Einsatz der ANO6 Δ SD-Chimäre neben der Bedeutung der Scrambling-Domäne von ANO6 auch ein möglicher regulatorischer Effekt von ANO6 im Rahmen der Substrat-Protease-Interaktion deutlich (Abbildung 11). Innerhalb dieser Chimäre wurde die nach Yu et al. beschriebene Scrambling-Domäne von ANO6 im Bereich der

Aminosäure 524 bis 558 durch den korrespondierenden Bereich aus ANO1 (AS 580-614) ausgetauscht (Yu u. a., 2015). Dadurch verlor diese Chimäre die Eigenschaft PS nach einer Erhöhung des intrazellulären Kalziumlevels zu externalisieren. Dies steht im Einklang mit den Daten von Schreiber et al. und Yu et al (Schreiber u. a., 2018; Yu u. a., 2015). Der Einsatz der Chimäre führte jedoch zu einer veränderten Proteasebeteiligung an der Freisetzung von AREG und TGF-alpha, ähnlich der Beteiligung der Proteasen von ANO6-überexprimierenden HEK293T-Zellen. Durch die fehlende PS-Externalisierung wäre ein Aufbruch der horizontalen Membranstruktur unwahrscheinlich und es wäre möglich, dass ANO6 Δ SD vergleichbar mit ANO6 Homodimere ausbildet, welche eine Plattform für Substrate und Proteasen bilden. Diese Vermutung konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter aufgeklärt werden und sollte ein Fokus neuer Untersuchungen sein.

Die Generierung und der Einsatz der konstitutiv aktiven ANO6-D408G-Mutante in HEK293T-Zellen bestätigte die Ergebnisse der Arbeitsgruppe, dass die Aktivität von ADAM17 durch exponiertes PS reguliert wird (Sommer u. a., 2016a). Dieses neue Werkzeug machte es möglich in Abwesenheit eines Stimulus die Auswirkung von exponiertem PS zu untersuchen. Durch die in Hinblick auf die PS-Externalisierung hyperaktive Natur dieser Mutante konnte gezeigt werden, dass die ADAM10- und ADAM17-vermittelte Substratfreisetzung nur durch einen vermehrten Anteil an exponiertem PS aktivierbar war.

Letztlich wirft dies die Frage auf, ob eine Verbindung von ANO6 und ADAM17 eine physiologische oder pathologische Relevanz aufweist. Die Expression und Shedding-Aktivität von ADAM17 steht mit der Kanzerogenese verschiedener Krebsarten, u.a. Brust- und Prostatakrebs in Verbindung (Duffy u. a., 2009; Lendeckel u. a., 2005; Murphy, 2008; Schmidt u. a., 2018). Dieser Zusammenhang kommt vor allem durch die verstärkte Freisetzung von EGFR-Liganden und des TNFR, auf die sowohl die vermehrte Proliferation von Krebszellen und deren verminderte Sensitivität gegenüber apoptotischen Signalen zurückzuführen ist (Scheller u. a., 2011; Sommer u. a., 2017). Im Rahmen eines Transkriptom-Screenings wurde ein alternatives ANO6-Transkript mit einem schlechteren Ausgang eines metastasefreien Überlebens von Brustkrebspatientinnen assoziiert (Dutertre u. a., 2010). Ein direkter Zusammenhang zwischen ANO6 und ADAM17 und deren Beteiligung an der Kanzerogenese gibt es zum jetzigen Zeitpunkt nicht, jedoch deuten einige Fakten daraufhin. Es ist bekannt, dass Krebszellen einen veränderten Kalziumhaushalt aufweisen, eine Dysregulation der Kalziumsignalwege vorliegt und diese mit den Krebsmerkmalen nach Hanahan und Weinberg

assoziiert sind (Cui u. a., 2017; Hanahan und Weinberg, 2011; Stewart u. a., 2015). In diesem Zusammenhang wird nicht explizit auf eine Verbindung zu ANO6 hingewiesen, doch zeigten die bisherigen Untersuchungen dieser Arbeit in Einklang mit der Literatur, dass ANO6 durch eine erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration aktiviert wird und daraufhin PS externalisiert (Grubb u. a., 2013; Schreiber u. a., 2018). Infolgedessen wäre es möglich, dass Krebszellen durch ihren dysregulierten Kalziumhaushalt einen erhöhten Anteil an exponiertem PS aufweisen. Genau diese Beobachtung trat bereits bei mehreren Krebsarten auf und exponiertes PS wird als möglicher Biomarker und Therapieansatz diskutiert (Sharma und Kanwar, 2018; Vallabhapurapu u. a., 2015; Zhao u. a., 2016).

Daher wäre ein Aktivierungsmechanismus basierend auf einer Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration, einer ANO6-vermittelten PS-Exposition und einer erhöhten Freisetzung von ADAM17-Substraten in verschiedenen Pathogenesen denkbar (Abbildung 24).

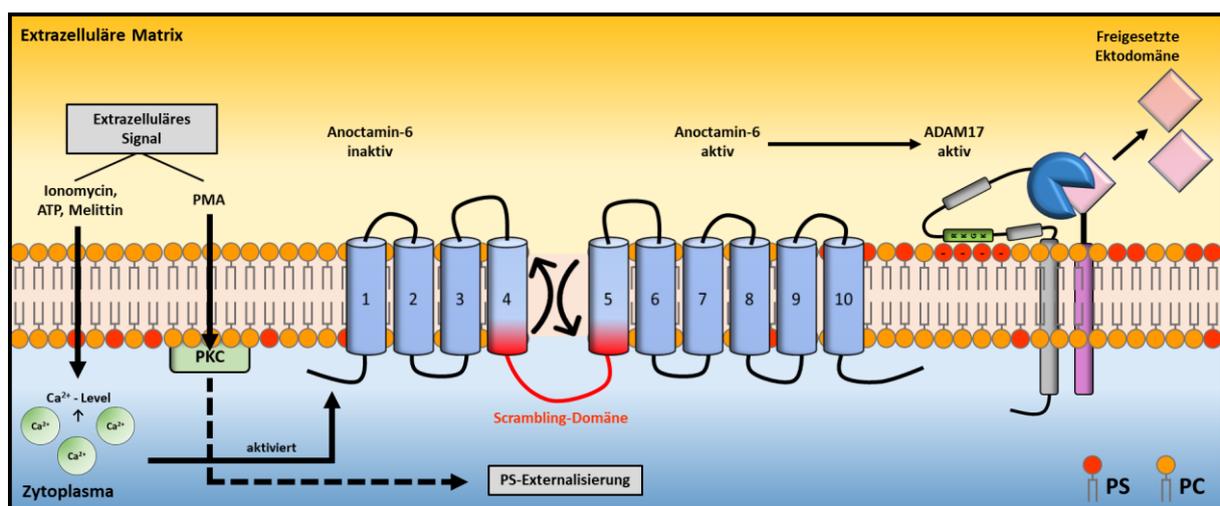


Abbildung 24: Aktivierung der ADAM17-vermittelten Substratfreisetzung durch Anoctamin-6. ANO6 ist eine kalziumabhängige Scramblase. Durch den Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration durch exogene Stimulanzien, wie Ionomycin, ATP oder Melittin wird die Scramblase-Funktion von ANO6 aktiviert und es kommt zu einem bidirektionalen, unspezifischen Phospholipidtransport entlang der Konzentrationsgradienten der Phospholipide. Durch diese PS-Externalisierung kann das polykationische RKGK-Motiv der MPD von ADAM17 mit exponiertem PS interagieren und es kommt zur Substratfreisetzung. Neben der ANO6-vermittelten PS-Externalisierung existieren ANO6-unabhängige Mechanismen der PS-Externalisierung, u.a. durch die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC), welche ebenfalls zur Aktivierung von ADAM17 führen.

5.2 ADAM17 KANN DURCH ANDERE SIGNALWEGE UNABHÄNGIG VON ANOCTAMIN-6 AKTIVIERT WERDEN

Im Rahmen dieser Arbeit wurde auch der klassische ADAM17-Aktivator PMA und dessen Einfluss auf überexprimiertes ANO6 untersucht. Dazu wurden HEK293T-Zellen mit 300 ng/ml

PMA stimuliert. Diese Konzentration bewegt sich im Rahmen der in der Literatur verwendeten Mengen (Arribas u. a., 1996; Lorenzen u. a., 2016; Schwarz u. a., 2013). Es ist bereits bekannt, dass PMA zur Aktivierung der Proteinkinase C führt und in verschiedenen Zelltypen wie Keratinozyten oder Thrombozyten eine PS-Externalisierung bewirkt (Robinson, 1992; Sommer u. a., 2016a). Aus diesem Grund sollte ein möglicher Zusammenhang zwischen der PMA-induzierten PS-Externalisierung und ANO6 analysiert werden. Dabei zeigte sich, dass eine ANO6-Überexpression keinen Einfluss auf die durch PMA induzierte AREG- oder TGF-alpha-Freisetzung in HEK293T-Zellen hatte (Abbildung 13). Bereits bei der Kontrolle konnte ein signifikanter Anstieg der Substratfreisetzung durch eine PMA-Stimulation verzeichnet werden. Ob es sich hierbei bereits um eine Aktivierung des endogenen ANO6 in HEK293T-Zellen handelt, kann nicht ausgeschlossen werden und müsste anhand von einem *Knock-Out*-Modell untersucht werden. Im Vergleich zu anderen Stimulanzen war durch eine ANO6-Überexpression jedoch stets ein signifikanter Anstieg der Substratfreisetzung zu detektieren. Daher ist es möglich, dass PMA einen anderen, ANO6-unabhängigen Mechanismus der PS-Externalisierung und somit ADAM17 aktiviert (Abbildung 24).

Es ist wahrscheinlich, dass auch andere Scramblasen über verschiedene Signalwege eine PS-Exposition bewirken und dadurch die ADAM17-vermittelte Substratfreisetzung aktivieren. So ist z.B. Xkr8 als eine Caspase-abhängige Scramblase beschrieben (Mariño und Kroemer, 2013). Während der Apoptose vermittelt Xkr8 die Externalisierung von PS und es ist ebenfalls bekannt, dass ADAM17 während der Apoptose vermehrt aktiv ist (Sivagnanam u. a., 2017; Vidlickova u. a., 2016). Neuste Untersuchungen in murinen B-Lymphozyten zeigen nun, dass Xkr8 ebenfalls durch eine Phosphorylierungsreaktion aktiviert werden kann (Sakuragi u. a., 2019). Eine Aktivierung anderer Scramblasen durch z.B. eine Phosphorylierung der PKC könnte somit ebenfalls zu einer Exposition von PS beitragen. Es ist auch nicht auszuschließen, dass neben ANO6 weitere Mitglieder der ANO-Familie in der Lage sind kompensatorisch die PS-Externalisierung zu übernehmen. Analysen hinsichtlich der Scramblasenfunktion und des entsprechenden Phospholipidtransports der ANO-Familie zeigten, dass auch ANO4, 7 und 9 in der Lage sind PS zu transportieren (Gyobu u. a., 2017; Nagata u. a., 2016).

Dieser kompensatorische Mechanismus anderer ANO-Mitglieder oder Scramblasen gegenüber ANO6 wird deutlicher, wenn die Auswirkungen einer ANO6-Defizienz betrachtet werden. Im Menschen führt das Scott-Syndrom, eine Krankheit basierend auf einem nicht-funktionalem ANO6 in Thrombozyten, zu einer geringen Blutgerinnungsstörung (Boisseau

u. a., 2018; Zwaal u. a., 2004). Wäre lediglich ANO6 mittels seiner Scramblase-Funktion für die PS-Externalisierung verantwortlich, wäre in Anbetracht der vielfältigen Funktionen einer PS-Exposition ein deutlich drastischerer Phänotyp zu erwarten. So können diese Zellen weiterhin u.a. während der Apoptose PS externalisieren (Sommer u. a., 2016a). Ein drastischerer Phänotyp ist in ANO6-defizienten Mäusen zu beobachten. Diese Defizienz kann je nach genetischem Hintergrund des Mausmodells zu einer pränatalen Letalität führen (Kretz u. a., 2014). In adulten Mäusen führt eine ANO6-Defizienz zu einer verminderten Knochenmineralisierung und dadurch zu einer Skelettdeformation (Ehlen u. a., 2013; Ousingsawat u. a., 2015). Zum anderen weisen ANO6-defiziente Mäuse Blutgerinnungsstörungen ähnlich dem Scott-Syndrom im Menschen auf (Yang u. a., 2012). Diese ausgeprägten Phänotypen scheinen jedoch nicht in Verbindung mit einer verminderten Aktivität von ADAM17 zu stehen. In Anbetracht der Ergebnisse dieser Arbeit und der essenziellen Funktion einer PS-Exposition in der Aktivierung von ADAM17 ist ein kompensatorischer Mechanismus durch andere Scramblasen innerhalb dieser Mausmodelle denkbar.

Neue Forschungsergebnisse von Baaten et al. postulieren, dass das ADAM10- und 17-vermittelte Shedding der Glykoproteine GPIb-alpha und GPVI unabhängig von einer PS-Externalisierung ist (Baaten u. a., 2018). Hierbei weisen Thrombozyten aus Scott-Syndrom-Patienten nach einer Ionomycin-Stimulation im Vergleich zu Kontrollzellen keine Einschränkungen in der Substratfreisetzung auf. Diese Ergebnisse stehen nicht im Einklang zu den Daten unserer Arbeitsgruppe, dass Leukozyten aus Scott-Syndrom-Patienten aufgrund ihrer fehlenden PS-Externalisierung eine verringerte L-Selektin-Freisetzung nach Ionomycin-Stimulation aufweisen (Sommer u. a., 2016a). Allerdings nutzten Baaten et al. in ihren Untersuchungen Thrombozyten und stimulierten diese mit einer hohen IO-Konzentration (10 μ M). Des Weiteren zeigten sie nicht, dass der Verlust der Glykoproteine von der Oberfläche der Scott-Thrombozyten nach der Stimulation durch ADAM10 oder ADAM17 vermittelt wurde. Es wäre denkbar, dass dieser Effekt durch die hohe IO-Konzentration und der Formation von Exosomen zustande kommt (Gutwein u. a., 2006). Hinzu kommt, dass im Rahmen dieser Arbeit die essenzielle Bedeutung der PS-Externalisierung für die ADAM17-Aktivität innerhalb eines Mausmodells bestätigt werden. Überraschenderweise berichten Baaten et al., dass das Glykoprotein-Shedding zwar durch die Inhibitoren GI und GW, jedoch nicht durch klassische Metalloprotease-Inhibitoren gehemmt werden konnte.

5.3 PHOSPHATIDYLSERIN IST ESSENZIELL FÜR DIE AKTIVITÄT VON ADAM17 IN VIVO

Unabhängig davon, ob der Mechanismus hinter der PS-Externalisierung durch ANO6 oder andere Scramblasen vermittelt wird, stellte sich letztlich jedoch die Frage, ob die Interaktion zwischen exponiertem PS und ADAM17 in vivo relevant ist. Zu diesem Zweck wurde in dieser Arbeit ein Mausmodell, in dem das PS-bindende RKGK-Motiv (R625, K626, K628) innerhalb der MPD von ADAM17 in ein neutral-geladenes GGGG-Motiv verändert wurde, untersucht. Dieses Modell sollte in der Theorie ADAM17-defizienten Mausmodellen ähneln, da die Sheddase-Funktion von ADAM17 essenziell von der Interaktion mit PS abhängig ist. Die Generierung des Mausmodells erfolgte durch die Firma Taconic Biosciences mittels CRISPR/Cas9-Genmodifikation und führte ebenfalls die *Off-Target-sites*-Analyse durch. Die generierten heterozygoten ADAM17^{WT/3x}-Mäuse zeigten keinen abweichenden Phänotyp gegenüber Wildtyp-Mäusen. Die Tierhaltung und anschließende Verpaarungen wurden durch die zentrale Tierhaltung des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein durchgeführt, wobei eine Verpaarung von heterozygoten ADAM17^{WT/3x}-Mäusen keine lebenden homozygoten ADAM17^{3x/3x}-Mäuse hervorbrachte. Dies steht im Einklang mit üblichen ADAM17-Mausmodellen von Peschon et al. und Horiuchi et al. (Tabelle 4) (Horiuchi u. a., 2007b; Peschon u. a., 1998). Bei diesen Modellen wurden unterschiedliche Mutationsstrategien verfolgt. Peschon et al. erzeugten durch gezielte Mutagenese eine veränderte katalytische Domäne, welche nicht mehr in der Lage war Zink zu binden, und dadurch zu einem funktional inaktiven Enzym (ADAM17^{ΔZn/ΔZn}) führte. Horiuchi et al. bedienten sich einer anderen Strategie, bei der es zu einer Deletion des codierenden DNA-Stranges durch das *loxP/Cre*-System kommt und dies zu ADAM17-defizienten Tieren (ADAM17^{-/-}) führt. Beide Strategien führten zu einer pränatalen Letalität um den Embryonaltag 18 (E18) und nur eine sehr geringe Anzahl an homozygoten ADAM17-defizienten Tieren überlebten bis einige Tage nach der Geburt. Im ADAM17^{3x/3x}-Modell trat eine Mendelsche Verteilung der Genotypen bis E14 auf. Eine Untersuchung des Herzschlages der Embryonen zeigte, dass der größte Teil dieser Embryonen viabel war (Tabelle 15). Die pränatale Letalität dieser ADAM17^{3x/3x}-Embryonen trat früher als in den genannten vergleichbaren Mausmodellen auf. Ursächlich dafür könnte der genetische Hintergrund des Modells sein. Während das ADAM17^{3x/3x}-Modell auf einem reinen C57Bl/6-Hintergrund aufbaut, basieren sowohl das Modell von Peschon et al. und Horiuchi et al. auf einem gemischten Hintergrund. Gelling et al. berichtete, dass ein gemischter Hintergrund aus C57Bl/6- und 129-Mäusen eine verlängerte Lebensspanne von

ADAM17^{ΔZn/ΔZn}-Mäusen zur Folge hatte (Gelling u. a., 2008). Die genaue Ursache dafür ist unklar. Auf eine Einkreuzung von 129-Mäusen in das ADAM17^{3x/3x}-Modell wurde verzichtet, da dies möglicherweise zwar eine verlängerte Lebensspanne der Embryonen jedoch mit hoher Wahrscheinlichkeit weiterhin eine pränatale Letalität zur Folge hätte und der genaue Hintergrund dieser verlängerten Lebensspanne nicht bekannt ist.

Besonders auffällig war das Auftreten von hämorrhagischen Läsionen im Kopfbereich von ADAM17^{3x/3x}-Embryonen an E14 (Abbildung 18). Etwa 50 % dieser Embryonen wiesen solch eine Auffälligkeit auf. In einem ADAM17^{ΔZn/ΔZn}-Modell von Canault et al. wurde dieses Phänomen ebenfalls beobachtet und weiterführend untersucht (Canault u. a., 2010). Dabei stellte sich heraus, dass diese Läsionen durch eine defekte Gefäßbildung während der Embryogenese auftreten und auf eine fehlende ADAM17-vermittelte Substratfreisetzung zurückzuführen sein. Im Rahmen der Gefäßbildung ist eine Freisetzung von ADAM17-Substraten, wie z.B. JAM-A oder VEGFR-2, von essenzieller Bedeutung (Laukoetter u. a., 2007; Swendeman u. a., 2008; Wojcikiewicz u. a., 2009).

Nun galt es zu untersuchen, ob der drastische Phänotyp der ADAM17^{3x/3x}-Mäuse auf Grund einer verminderten ADAM17-Aktivität auftrat. Hierzu wurden zuerst exemplarisch die Leber und der Kopfbereich der Embryonen verschiedener Genotypen auf ihre ADAM17-Expression untersucht. Dadurch sollten mögliche Nebeneffekte der Mutation, wie z.B. eine gestörte Reifung von ADAM17, analysiert werden. Die Expressionsanalyse der Leber und des Kopfbereiches zeigten eine vergleichbare Expression der Proform und gereiften Form von ADAM17 zwischen den unterschiedlichen Genotypen auf (Abbildung 19).

Um eine genauere Untersuchung dieses Modells zu ermöglichen wurden sowohl murine embryonale Fibroblasten (MEF) und murine embryonale Hepatozyten (MEH) am E14 aus Embryonen der verschiedenen Genotypen isoliert. Die Isolation dieser Zellen erfolgte anhand von üblichen Isolationstechniken und ist in Kapitel 3.9.2 und 3.9.3 ausführlich beschrieben (Durkin u. a., 2013; Strick-Marchand und Weiss, 2003). Um den Einfluss von exogenen Faktoren, morphologischen und funktionalen Veränderungen auf diese primären Zellen so gering wie möglich ausfallen zu lassen, wurden diese Zelllinien bereits 72 h nach ihrer Isolation für weitere Untersuchungen verwendet. Eine ADAM17-Expressionsanalyse von MEF und MEH zeigte ebenfalls eine vergleichbare Expression der Proform und gereiften Form innerhalb der unterschiedlichen Genotypen (Abbildung 20).

Neben der Expressionsanalyse von ADAM17 wurde auch ADAM10 untersucht. Um mögliche kompensatorische Mechanismen auszuschließen wurden exemplarisch Kopfgewebe, MEF und MEH auf ihre ADAM10-Expression analysiert. Die verschiedenen Genotypen wiesen dabei eine vergleichbare Expression der Proform und gereiften Form von ADAM10 in den unterschiedlichen Zellen auf. Eine Aussage über die Sheddase-Aktivität von ADAM10 kann diese Analyse nicht erbringen. Im weiteren Verlauf wurde der klassische ADAM17-Aktivator PMA verwendet um einen möglichen Einfluss von ADAM10 auszuschließen.

Neben einer vergleichbaren Expression ist die Zelloberflächenlokalisierung von ADAM17 essenziell für deren Sheddase-Funktion. Hierbei gibt es verschiedene Techniken um diese Lokalisation nachzuweisen. Eine sehr verbreitete Art des Nachweises ist die immunologische Detektion innerhalb der Durchflusszytometrie. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Nachweis von ADAM17 auf der Zelloberfläche von MEH mittels Durchflusszytometrie durchgeführt (nicht dargestellt) und führte zu keinem eindeutigen Ergebnis. Vor allem die Abhängigkeit dieser Technik von qualitativ hochwertigen Antikörpern gegen ein extrazelluläres Epitop von murinem ADAM17 führte letztlich zur Durchführung einer weiteren Nachweismethode.

Die Detektion von Proteinen auf der Zellmembranoberfläche kann auch mit Hilfe einer Oberflächenbiotinylierung durchgeführt werden. Hierbei bindet ein Biotinylierungsreagenz an exponierte Amine und ist zellimpermeable. Eine Fraktionierung dieser markierten Proteine und eine anschließende Expressionsanalyse dient dabei dem Nachweis der Oberflächenlokalisierung von ADAM17 und ist eine gängige Technik (Groth u. a., 2016b; Lorenzen u. a., 2016). Als Kontrollen für eine erfolgreiche Fraktionierung wurde EGFR und AKT getestet. Der EGFR ist ein klassisches Zelloberflächenmolekül und AKT ein zytosolisches Molekül. Die Analyse ergab, dass sowohl die Proform als auch die gereifte Form von ADAM17 in vergleichbarer Menge auf der Zelloberfläche von MEH der verschiedenen Genotypen lokalisiert ist (Abbildung 20). In der Literatur wird meist die gereifte Form von ADAM17 mit der Zelloberfläche assoziiert (Lorenzen u. a., 2016). Der Reifungsprozess von ADAM17 ist dabei von der Prozessierung im Golgi-Apparat und dem Transport zur Zelloberfläche abhängig. In einigen Fällen wurde auch die Proform von ADAM17 auf der Oberfläche beobachtet (Groth u. a., 2016b; Srour u. a., 2003). Das strukturell ähnliche ADAM10 wurde ebenfalls mehrfach in seiner Proform auf der Zelloberfläche nachgewiesen (Carey u. a., 2011). Neben der Proform ist die gereifte Form von ADAM17 deutlich auf der Zelloberfläche lokalisiert, sodass eine

negative Auswirkung der Mutation auf die Oberflächenlokalisierung und Reifung innerhalb des ADAM17^{3x/3x}-Modells ausgeschlossen werden konnte.

Nachdem bereits die Expression und Oberflächenlokalisierung von ADAM17 untersucht wurden, galt es zu klären, ob die Sheddase-Funktion durch die Mutation des RKGK-Motivs eingeschränkt ist. Dazu wurden wiederum MEH-Zellen isoliert und weiterführend untersucht. Im Gegensatz zu MEFs ist ein breites Spektrum von ADAM17-Substraten in Hepatozyten beschrieben (McMahan u. a., 2013; Murthy u. a., 2010). Vor Beginn einer funktionalen Analyse von ADAM17 musste zuerst getestet werden, ob MEH der verschiedenen Genotypen im gleichen Rahmen PS externalisieren können. Dazu wurden MEH für 30 min mit 200 ng/ml PMA inkubiert. Mittels einer Annexin V-Färbung wurde exponiertes PS angefärbt und anschließend quantitativ ausgewertet. Dabei zeigte sich, dass MEH der unterschiedlichen Genotypen im gleichen Ausmaß PS nach einer PMA-Stimulation externalisieren (Abbildung 22).

Im Folgenden wurden MEH auf die Expression verschiedener ADAM17-Substrate hin untersucht. Dabei konnten die Substrate IL-6R, AREG und TGF-alpha in diesen Zellen nicht nachgewiesen werden (nicht dargestellt). Eine mögliche Ursache dafür könnte sein, dass diese MEH noch keine endgültig differenzierten Hepatozyten sind und zu diesem Zeitpunkt (E14) des Entwicklungsstadiums einige Substrate noch nicht exprimiert werden. Es konnte jedoch das ADAM17-Substrat TNFR1 in MEH nachgewiesen werden. Der TNFR1 gilt als klassisches Substrat von ADAM17 und die Freisetzung kann durch PMA-Stimulation induziert werden (Krunkosky u. a., 2005; Xia u. a., 2002). Die Analyse der Sheddase-Funktion von ADAM17 erfolgte anhand einer PMA-Stimulation und der quantitativen Analyse des TNFR1 mittels ELISA. Dafür wurde der in Überstand des Stimulationsmediums freigesetzte TNFR1 in das Verhältnis zum Gesamtgehalt des TNFR1 in MEH gesetzt. Wie bereits erwähnt, konnte durch eine PMA-Stimulation sicher gestellt werden, dass keine Aktivierung von ADAM10 und somit Beteiligung an der Substratfreisetzung erfolgte (Sahin u. a., 2004). Dabei wurde deutlich, dass in ADAM17^{3x/3x}-Embryonen bereits unter konstitutiven Bedingungen ein signifikant vermindertes TNFR1-Shedding gegenüber den anderen Genotypen auftrat (Abbildung 23). Während in Wildtyp- und heterozygoten ADAM17^{WT/3x}-MEH die Freisetzung von TNFR1 durch PMA erhöht werden konnte, wiesen ADAM17^{3x/3x}-MEH keine PMA-induzierbare Sheddase-Aktivität auf. Diese Ergebnisse machten deutlich, dass durch eine Mutation des RKGK-Motivs die Sheddase-Funktion von ADAM17 signifikant eingeschränkt ist.

Zusätzlich zur Untersuchung der ADAM17-vermittelten Substratfreisetzung wurde überprüft ob MEH aus ADAM17^{3x/3x}-Embryonen in ihrer katalytischen Fähigkeit eingeschränkt waren. Hierzu wurde eine Methode gewählt, die darauf beruht, dass ein lösliches fluorogenes Peptid unabhängig von der PS-Externalisierung und einer folgenden Interaktion zwischen exponiertem PS und ADAM17 prozessiert wird. Diese Peptide werden üblicherweise in vitro mit rekombinanten Proteinen inkubiert und dienen der Einschätzung der katalytischen Aktivität von ADAM17 (Neumann u. a., 2004). Der Einsatz in einem zellulären Kontext ist aufgrund der geringen Spezifität der Schnittstelle nur mit Hilfe der Verwendung von unterschiedlichen Protease-Inhibitoren möglich. In Vorversuchen (nicht dargestellt) zeigte sich, dass das lösliche Peptid u.a. durch Serinproteasen prozessiert werden konnte. Aus diesem Grund wurde in den folgenden Untersuchungen in Gegenwart des Serinprotease-Inhibitors AEBSF gearbeitet. Die quantitative Analyse der Fluoreszenzsignals des gespaltenen Peptids zeigte in Wildtyp und ADAM17^{3x/3x}-MEH eine Reduktion in Gegenwart des ADAM17-Inhibitors GW. Der inhibitorische Effekt des ADAM10-Inhibitors GI fiel signifikant geringer aus. In heterozygoten ADAM17^{WT/3x}-MEH konnte nur eine tendenzielle Reduktion der Peptidspaltung durch GW beobachtet werden. Daraus konnte geschlussfolgert werden, dass die katalytische Funktion von ADAM17 durch die Mutation des RKGK-Motivs nicht beeinträchtigt ist. Da jedoch durch die funktionale Analyse der TNFR1-Freisetzung eine verminderte Sheddase-Aktivität von ADAM17 zu verzeichnen war, wurde deutlich, dass ein Unterschied zwischen der reinen katalytischen Funktion und der Substratfreisetzung von ADAM17 existiert. Diese Sheddase-Funktion ist basierend auf diesen Ergebnissen essenziell von einer PS-Externalisierung abhängig.

5.4 AUSBLICK

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Interaktion von exponiertem PS und ADAM17 von essenzieller Bedeutung ist. Innerhalb dieses Aktivierungsmechanismus kann ANO6 durch seine kalziumabhängige Scramblase-Funktion einen regulatorischen Einfluss auf die ADAM10- und ADAM17-vermittelte Substratfreisetzung ausüben. Des Weiteren ergaben sich auch neue interessante Fragestellungen, die in den Fokus neuer Forschungsarbeiten treten könnten.

Zum einen zeigten die Untersuchungen bezüglich einer ANO6-Überexpression und einer verstärkten PS-Externalisierung, dass neben ADAM17 auch ADAM10 und weitere unbekannte

Metalloproteasen vermehrt an der Substratfreisetzung beteiligt waren. Dies lässt die Vermutung zu, dass ein Aktivierungsmechanismus durch eine PS-Exposition auf der äußeren Membranseite nicht ausschließlich ein Phänomen für ADAM10 und ADAM17 sein könnte, sondern auch ein größeres Spektrum von Proteasen betrifft. Durch die Generierung der konstitutiv aktiven ANO6-D408G-Mutante existiert nun ein Werkzeug für eine weiterführende Analyse, bei der ausschließlich in Abhängigkeit einer PS-Externalisierung die Proteasebeteiligung untersucht werden könnte.

Neben dem Einfluss von ANO6 wurde deutlich, dass auch ein kalziumunabhängiger Mechanismus zur PS-Externalisierung, u.a. die Aktivierung der PKC, existiert. Wie in der Literatur beschrieben ist, könnte Xkr8 ein mögliches Ziel einer Phosphorylierungskaskade sein. Die mögliche Beteiligung weiterer Scramblasen könnte anhand einer Aufklärung dieses Signalweges weiter aufgeklärt werden.

Anhand des in der Literatur beschriebenen verstärkten Auftretens von exponiertem PS in Krebserkrankungen und der Assoziation mit entzündlichen Erkrankungen lässt die Verbindung von ADAM17 mit diesen Krankheiten die Frage nach einem möglichen therapeutischen Ansatz offen. Wie bereits diskutiert, scheint eine verstärkte PS-Externalisierung ein möglicher Biomarker für Krebserkrankungen zu sein. Die gezielte Erkennung dieser entarteten Zellen anhand des exponierten PS könnte in Kombination mit der Regulation der Sheddase-Aktivität durch geeignete Inhibitoren von ADAM17 einen möglichen Ansatz zur Therapie bieten.

Neben des Aktivierungsmechanismus von Proteasen wie ADAM10 und ADAM17 ist die Protein-Protein-Interaktion und damit einhergehend die Substraterkennung dieser Proteasen ein weiteres entscheidendes Forschungsfeld. Die räumliche Anordnung innerhalb von Nanodomänen der Membran und deren Interaktionsmöglichkeiten könnten weitere regulatorische Maßnahmen offenlegen und somit schlussendlich auch neue Therapieansätze bieten.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die proteolytische Freisetzung von membrangebundenen Wachstumsfaktoren, Zytokinen, Rezeptoren und Adhäsionsmolekülen, durch ADAM17, *a disintegrin and metalloproteinase 17*, stellt einen essenziellen Prozess in der physiologischen Entwicklung des Menschen dar. Eine Defizienz oder Dysregulation dieser Protease ist mit dem Auftreten von Entzündungsreaktionen und der Proliferation von Krebszellen assoziiert. Trotz dieser außerordentlichen Funktionen ist der genaue Mechanismus hinter der Aktivierung von ADAM17 nur rudimentär aufgeklärt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine neue Hypothese aufgegriffen, bei der die asymmetrische Verteilung des Phospholipids Phosphatidylserin (PS) innerhalb der Zellmembran als Regulator von ADAM17 agiert. Im zellulären Kontext erfolgt eine temporäre Aufhebung der Membran-Asymmetrie u.a. durch Scramblasen. In diesem Zusammenhang wurde die Frage untersucht, ob exogene ADAM-Aktivatoren wie Adenosintriphosphat, Ionomycin oder Phorbol ester die Exposition von Phosphatidylserin auf der äußeren Seite der Zellmembran mittels der Scramblase Anoctamin-6 (ANO6) verstärken und so die ADAM17 vermittelte Substratfreisetzung regulieren.

Hierbei konnte *in vitro* gezeigt werden, dass ein Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration bei einer ANO6-Überexpression zu einer verstärkten PS-Externalisierung und einer daraus resultierenden vermehrten Freisetzung von Substraten sowohl durch ADAM17 als auch ADAM10 erfolgte. Um unabhängig von exogenen Stimulanzen die Aktivierung von ADAM17 zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit erstmals die humane ANO6-D408G-Mutante generiert. Diese Mutante ist aufgrund ihrer erhöhten Kalziumsensitivität in der Lage unter konstitutiven Bedingungen PS zu externalisieren und führte in Untersuchungen bei einer Überexpression zu einer vermehrten Substratfreisetzung durch ADAM10 und ADAM17. Dadurch wurde der essenzielle Aspekt der PS-Exposition für die ADAM17-Aktivierung bestätigt und eine mögliche Mediatorrolle von ANO6 in diesem Mechanismus nahegelegt.

Schließlich wurde die daraus resultierende Frage, ob die Aktivierung von ADAM17 durch PS *in vivo* relevant sei, anhand eines CRISPR-Cas9 generierten Mausmodells analysiert. Hierbei wurde das polykationische PS-bindende RKGK-Motiv innerhalb der membranproximalen Domäne von ADAM17 zu einem neutral-geladenen Motiv (ADAM17^{3x/3x}) verändert. Diese

Mutation führte zu einer pränatalen Letalität der homozygoten ADAM17^{3x/3x}-Mäuse um den Embryonaltag 14,5 herum. Nachweislich war weder die Expression, noch die Oberflächenlokalisierung oder die katalytische Funktion von ADAM17 durch diese Mutation beeinflusst. Anhand von isolierten murinen embryonalen Hepatozyten wurde deutlich, dass das ADAM17-vermittelte Shedding in ADAM17^{3x/3x}-Mäusen konstitutiv deutlich vermindert und nicht induzierbar war.

In der Gesamtheit konnten die Ergebnisse dieser Arbeit die neuartige Hypothese eines regulatorischen Einflusses der Zellmembran-Asymmetrie in der Aktivierung von ADAM17 in vitro bestätigen und die essenzielle Bedeutung in vivo erstmals zeigen. ANO6 stellt hierbei als kalziumabhängige Scramblase eine mögliche Verbindung zwischen einem intrazellulären Kalziumanstieg und der vermehrten Substratfreisetzung durch ADAM10 und ADAM17 dar.

7 SUMMARY

The proteolytic cleavage of membrane-bound growth factors, cytokines, receptors and adhesions molecules through „a disintegrin and metalloproteinase 17“ (ADAM17) represents an essential process within normal physiological development in human. A deficiency or dysregulation of this protease is associated with inflammation and cancer. Even though ADAM17 has such remarkable functions, the mechanism behind its activation is poorly understood.

In the context of this thesis, a novel hypothesis covering the regulatory effect of the phospholipid phosphatidylserine (PS) and its essential exposure within the outer leaflet of the membrane for ADAM17 sheddase function was picked up. The naturally occurring membrane asymmetry and its temporary vertical breakup occur e.g. through scramblases. With this in mind, the question arose if exogenic ADAM activators such as adenosine triphosphate, ionomycin or phorbol esters lead to a PS exposure via the scramblase anoctamin-6 (ANO6) and thus increased ADAM17-mediated substrate shedding.

Hereby it was shown in vitro, that an increase of the intracellular calcium level and ANO6-overexpression led to a rise of externalized PS and resulted in an increasing amount of cleaved substrates by ADAM17 as well as ADAM10. For the first time, the human mutant ANO6-D408G was generated to analyse ADAM17 activation independent of exogenic stimuli. This mutant is able to externalize PS under constitutive conditions due to an increased calcium sensitivity. As expected overexpression of this mutant led to a significant increase of exposed PS followed by enhanced substrate cleavage via ADAM10 and ADAM17. Therefore, these experiments underline an essential role of PS exposure for ADAM17 activation and suggest a role for ANO6 as a possible mediator within this mechanism.

Ultimately, the resulting question of in vivo relevance for the interaction between ADAM17 and PS had to be analysed. Using a CRISPR-Cas9 generated mouse model (ADAM17^{3x/3x}) the positively charged PS-binding motif (RKGK) within the membrane-proximal domain of ADAM17 was mutated towards a neutrally charged motif. This mutation led to a prenatal lethality of homozygous ADAM17^{3x/3x} mice around the time of embryonal day 14,5. Verifiably, this mutation did not alter the expression, surface location or catalytic activity of ADAM17. Via isolated murine embryonic hepatocytes, it was analysed that the reason was an impaired constitutive ADAM17 sheddase function which also could not be induced.

In conclusion, the results of this thesis confirm that membrane asymmetry and its temporary breakup mark a novel mechanism for ADAM17 activation *in vitro*. For the first time, it was shown that interaction between ADAM17 and PS indeed is essential *in vivo*. Within this mechanism, the calcium-dependent scramblase ANO6 could act as a mediator between an increase of intracellular calcium level and an enhanced shedding by ADAM10 and ADAM17.

8 LITERATURVERZEICHNIS

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., und Walter, P. (2002). *The Lipid Bilayer*.

Andreeva, T. V., Tyazhelova, T. V., Rykalina, V.N., Gusev, F.E., Goltsov, A.Y., Zolotareva, O.I., Aliseichik, M.P., Borodina, T.A., Grigorenko, A.P., Reshetov, D.A., u. a. (2016). Whole exome sequencing links dental tumor to an autosomal-dominant mutation in ANO5 gene associated with gnathodiaphyseal dysplasia and muscle dystrophies. *Sci. Rep.* 6, 26440.

Arduise, C., Abache, T., Li, L., Billard, M., Chabanon, A., Ludwig, A., Mauduit, P., Boucheix, C., Rubinstein, E., Le Naour, F., u. a. (2008). Tetraspanins regulate ADAM10-mediated cleavage of TNF- α and epidermal growth factor. *J. Immunol.* 181, 7002–7013.

Arribas, J., und Esselens, C. (2009). ADAM17 as a Therapeutic Target in Multiple Diseases. *Curr. Pharm. Des.* 15, 2319–2335.

Arribas, J., Coodly, L., Vollmer, P., Kishimoto, T.K., Rose-John, S., und Massagué, J. (1996). Diverse cell surface protein ectodomains are shed by a system sensitive to metalloprotease inhibitors. *J. Biol. Chem.* 271, 11376–11382.

Baaten, C.C.F.M.J., Swieringa, F., Misztal, T., Mastenbroek, T.G., Feijge, M.A.H., Bock, P.E., Donners, M.M.P.C., Collins, P.W., Li, R., van der Meijden, P.E.J., u. a. (2018). Platelet heterogeneity in activation-induced glycoprotein shedding: functional effects. *Blood Adv.* 2, 2320–2331.

Balreira, A., Boczonadi, V., Barca, E., Pyle, A., Bansagi, B., Appleton, M., Graham, C., Hargreaves, I.P., Rasic, V.M., Lochmüller, H., u. a. (2014). ANO10 mutations cause ataxia and coenzyme Q10 deficiency. *J. Neurol.* 261, 2192–2198.

Bangham, A.D. (1968). Membrane models with phospholipids. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 18, 29–95.

Bean, R.C., Shepherd, W.C., und Chan, H. (1968). Permeability of lipid bilayer membranes to organic solutes. *J. Gen. Physiol.* 52, 495–508.

Bean, R.C., Shepherd, W.C., Chan, H., und Eichner, J. (1969). Discrete conductance fluctuations in lipid bilayer protein membranes. *J. Gen. Physiol.* 53, 741–757.

- Bell, J.H., Herrera, A.H., Li, Y., und Walcheck, B. (2007). Role of ADAM17 in the ectodomain shedding of TNF- and its receptors by neutrophils and macrophages. *J. Leukoc. Biol.* *82*, 173–176.
- Bera, T.K., Das, S., Maeda, H., Beers, R., Wolfgang, C.D., Kumar, V., Hahn, Y., Lee, B., und Pastan, I. (2004). NGEF, a gene encoding a membrane protein detected only in prostate cancer and normal prostate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 3059–3064.
- Berasain, C., und Avila, M.A. (2014). Amphiregulin. *Semin. Cell Dev. Biol.* *28*, 31–41.
- Bethel, N.P., und Grabe, M. (2016). Atomistic insight into lipid translocation by a TMEM16 scramblase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *113*, 14049–14054.
- Bevers, E.M., und Williamson, P.L. (2016). Getting to the Outer Leaflet: Physiology of Phosphatidylserine Exposure at the Plasma Membrane. *Physiol. Rev.* *96*, 605–645.
- Bevers, E.M., Comfurius, P., Van Rijn, J.L.M.L., Hemker, H.C., und Robert, F.A.Z. (1982). Generation of Prothrombin-Converting Activity and the Exposure of Phosphatidylserine at the Outer Surface of Platelets. *Eur. J. Biochem.* *122*, 429–436.
- Bevers, E.M., Comfurius, P., und Zwaal, R.F.A.A. (1983). Changes in membrane phospholipid distribution during platelet activation. *BBA - Biomembr.* *736*, 57–66.
- Blanchot-Jossic, F., Jarry, A., Masson, D., Bach-Ngohou, K., Paineau, J., Denis, M.G., Laboisie, C.L., und Mosnier, J.-F. (2005). Up-regulated expression of ADAM17 in human colon carcinoma: co-expression with EGFR in neoplastic and endothelial cells. *J. Pathol.* *207*, 156–163.
- Blaustein, M.P., und Goldring, J.M. (1975). Membrane potentials in pinched-off presynaptic nerve terminals monitored with a fluorescent probe: evidence that synaptosomes have potassium diffusion potentials. *J. Physiol.* *247*, 589–615.
- Blaydon, D.C., Biancheri, P., Di, W.-L.L., Plagnol, V., Cabral, R.M., Brooke, M.A., van Heel, D.A., Ruschendorf, F., Toynbee, M., Walne, A., u. a. (2011). Inflammatory skin and bowel disease linked to ADAM17 deletion. *N Engl J Med* *365*, 1502–1508.
- Bleibaum, F., Sommer, A., Veit, M., Rabe, B., Andrä, J., Kunzelmann, K., Nehls, C., Correa, W., Gutsmann, T., Grötzinger, J., u. a. (2019). ADAM10 sheddase activation is controlled by cell membrane asymmetry. *J. Mol. Cell Biol.*

Blobel, C.P. (2005). ADAMs: key components in EGFR signalling and development. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 32–43.

Blobel, C.P., Wolfsberg, T.G., Turck, C.W., Myles, D.G., Primakoff, P., und White, J.M. (1992). A potential fusion peptide and an integrin ligand domain in a protein active in sperm–egg fusion. *Nature* 356, 248–252.

Van Den Bogaart, G., Guzmán, J.V., Mika, J.T., und Poolman, B. (2008). On the mechanism of pore formation by melittin. *J. Biol. Chem.* 283, 33854–33857.

Boisseau, P., Bene, M.C., Besnard, T., Pachcek, S., Giraud, M., Talarmain, P., Robillard, N., Gourlaouen, M.A., Bezieau, S., und Fouassier, M. (2018). A new mutation of ANO6 in two familial cases of Scott syndrome. *Br. J. Haematol.* 180, 750–752.

Boon, J.M., Lambert, T.N., Sisson, A.L., Davis, A.P., und Smith, B.D. (2003). Facilitated Phosphatidylserine (PS) Flip-Flop and Thrombin Activation Using A Synthetic PS Scramblase. *J. Am. Chem. Soc.* 125, 8195–8201.

Bretscher, M.S. (1972). Asymmetrical Lipid Bilayer Structure for Biological Membranes. *Nat. new Biol.* 240, 226–229.

Brown, D.A., und London, E. (2000). Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J. Biol. Chem.* 275, 17221–17224.

Brunner, J.D., Lim, N.K., Schenck, S., Duerst, A., und Dutzler, R. (2014). X-ray structure of a calcium-activated TMEM16 lipid scramblase. *Nature* 516.

Canault, M., Certel, K., Schatzberg, D., Wagner, D.D., und Hynes, R.O. (2010). The lack of ADAM17 activity during embryonic development causes hemorrhage and impairs vessel formation. *PLoS One* 5, 1–6.

Carey, R.M., Blusztajn, J.K., und Slack, B.E. (2011). Surface expression and limited proteolysis of ADAM10 are increased by a dominant negative inhibitor of dynamin. *BMC Cell Biol.* 12, 20.

Castoldi, E., Collins, P.W., Williamson, P.L., und Bevers, E.M. (2011). Compound heterozygosity for 2 novel TMEM16F mutations in a patient with Scott syndrome. *Blood* 117, 4399–4400.

Chalaris, A., Adam, N., Sina, C., Rosenstiel, P., Lehmann-Koch, J., Schirmacher, P., Hartmann, D., Cichy, J., Gavrilova, O., Schreiber, S., u. a. (2010). Critical role of the disintegrin metalloprotease ADAM17 for intestinal inflammation and regeneration in mice. *J. Exp. Med.* *207*, 1617–1624.

Charlesworth, G., Plagnol, V., Holmström, K.M., Bras, J., Sheerin, U.M., Preza, E., Rubio-Agusti, I., Ryten, M., Schneider, S.A., Stamelou, M., u. a. (2012). Mutations in ANO3 cause dominant craniocervical dystonia: Ion channel implicated in pathogenesis. *Am. J. Hum. Genet.* *91*, 1041–1050.

Clark, M.R. (2011). Flippin' lipids. *Nat. Immunol.* *12*, 373–375.

Cui, C., Merritt, R., Fu, L., und Pan, Z. (2017). Targeting calcium signaling in cancer therapy. *Acta Pharm. Sin. B* *7*, 3–17.

Cybulsky, M.I., Iiyama, K., Li, H., Zhu, S., Chen, M., Iiyama, M., Davis, V., Gutierrez-Ramos, J.C., Connelly, P.W., und Milstone, D.S. (2001). A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. *J. Clin. Invest.* *107*, 1255–1262.

Daniel, L., und Kai, S. (2010). Lipid Rafts As a Membrane- Organizing Principle. *Science* (80-). *327*, 46–50.

Duffy, M.J., McKiernan, E., O'Donovan, N., und McGowan, P.M. (2009). Role of ADAMs in cancer formation and progression. *Clin. Cancer Res.* *15*, 1140–1144.

Duran, C., Qu, Z., Osunkoya, A.O., Cui, Y., und Hartzell, H.C. (2012). ANOs 3-7 in the anoctamin/Tmem16 Cl⁻ channel family are intracellular proteins. *AJP Cell Physiol.* *302*, C482–C493.

Durkin, M.E., Qian, X., Popescu, N.C., und Lowy, D.R. (2013). Isolation of Mouse Embryo Fibroblasts. *Bio-protocol* *3*.

Düsterhöft, S., Jung, S., Hung, C.-W.W., Tholey, A., Sönnichsen, F.D., Grötzinger, J., und Lorenzen, I. (2013). Membrane-proximal domain of a disintegrin and metalloprotease-17 represents the putative molecular switch of its shedding activity operated by protein-disulfide isomerase. *J. Am. Chem. Soc.* *135*, 5776–5781.

Düsterhöft, S., Michalek, M., Kordowski, F., Oldefest, M., Sommer, A., Röseler, J., Reiss, K., Grötzinger, J., Lorenzen, I., Düsterhöft, S., u. a. (2015). Extracellular Juxtamembrane Segment of ADAM17 Interacts with Membranes and Is Essential for Its Shedding Activity. *Biochemistry* 54, 5791–5801.

Dutertre, M., Lacroix-Triki, M., Driouch, K., de la Grange, P., Gratadou, L., Beck, S., Millevoi, S., Tazi, J., Lidereau, R., Vagner, S., u. a. (2010). Exon-Based Clustering of Murine Breast Tumor Transcriptomes Reveals Alternative Exons Whose Expression Is Associated with Metastasis. *Cancer Res.* 70, 896–905.

Edwards, D.R., Handsley, M.M., und Pennington, C.J. (2008). The ADAM metalloproteinases. *Mol. Aspects Med.* 29, 258–289.

Ehlen, H.W.A., Chinenkova, M., Moser, M., Munter, H.M., Krause, Y., Gross, S., Brachvogel, B., Wuelling, M., Kornak, U., und Vortkamp, A. (2013). Inactivation of anoctamin-6/Tmem16f, a regulator of phosphatidylserine scrambling in osteoblasts, leads to decreased mineral deposition in skeletal tissues. *J. Bone Miner. Res.* 28, 246–259.

Fadok, V.A., Bratton, D.L., Rose, D.M., Pearson, A., Ezekewitz, R.A.B., und Henson, P.M. (2000). A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature* 405, 85–90.

Fahy, E., Subramaniam, S., Murphy, R.C., Nishijima, M., Raetz, C.R.H., Shimizu, T., Spener, F., van Meer, G., Wakelam, M.J.O., und Dennis, E.A. (2009). Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids. *J. Lipid Res.* 50, S9–S14.

Fairbanks, G., Steck, T.L., und Wallach, D.F.H. (1971). Electrophoretic Analysis of the Major Polypeptides of the Human Erythrocyte Membrane. *Biochemistry* 10, 2606–2617.

Fairless, R., Beck, A., Kravchenko, M., Williams, S.K., Wissenbach, U., Diem, R., und Cavalié, A. (2013). Membrane potential measurements of isolated neurons using a voltage-sensitive dye. *PLoS One* 8, e58260.

Ferrera, L., Scudieri, P., Sondo, E., Caputo, A., Caci, E., Zegarra-Moran, O., Ravazzolo, R., und Galletta, L.J. V (2011). A minimal isoform of the TMEM16A protein associated with chloride channel activity. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1808, 2214–2223.

Fischer, O.M., Hart, S., Gschwind, A., und Ullrich, A. (2003). EGFR signal transactivation in cancer cells. *Biochem. Soc. Trans.* 31, 1203–08.

Folgosa, L., Zellner, H.B., El Shikh, M.E., und Conrad, D.H. (2013). Disturbed Follicular Architecture in B Cell A Disintegrin and Metalloproteinase (ADAM)10 Knockouts Is Mediated by Compensatory Increases in ADAM17 and TNF- Shedding. *J. Immunol.* *191*, 5951–5958.

Fujii, T., Sakata, A., Nishimura, S., Eto, K., und Nagata, S. (2015). TMEM16F is required for phosphatidylserine exposure and microparticle release in activated mouse platelets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *112*, 12800–12805.

Le Gall, S.M., Bobé, P., Reiss, K., Horiuchi, K., Niu, X.-D., Lundell, D., Gibb, D.R., Conrad, D., Saftig, P., und Blobel, C.P. (2009). ADAMs 10 and 17 Represent Differentially Regulated Components of a General Shedding Machinery for Membrane Proteins Such as Transforming Growth Factor α , L-Selectin, and Tumor Necrosis Factor α . *Mol. Biol. Cell* *20*, 1785–1794.

Le Gall, S.M., Maretzky, T., Issuree, P.D.A., Niu, X.-D., Reiss, K., Saftig, P., Khokha, R., Lundell, D., und Blobel, C.P. (2010). ADAM17 is regulated by a rapid and reversible mechanism that controls access to its catalytic site. *J. Cell Sci.* *123*, 3913–3922.

Garbers, C., Jänner, N., Chalaris, A., Moss, M.L., Floss, D.M., Meyer, D., Koch-Nolte, F., Rose-John, S., und Scheller, J. (2011). Species specificity of ADAM10 and ADAM17 proteins in interleukin-6 (IL-6) trans-signaling and novel role of ADAM10 in inducible IL-6 receptor shedding. *J. Biol. Chem.* *286*, 14804–14811.

Di Garbo, A., Alloisio, S., und Nobile, M. (2012). P2X7 receptor-mediated calcium dynamics in HEK293 cells: Experimental characterization and modelling approach. *Phys. Biol.* *9*, 026001.

Garton, K.J., Gough, P.J., Philalay, J., Wille, P.T., Blobel, C.P., Whitehead, R.H., Dempsey, P.J., und Raines, E.W. (2003). Stimulated shedding of vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) is mediated by tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (ADAM 17). *J. Biol. Chem.* *278*, 37459–37464.

Gelling, R.W., Yan, W., Al-Noori, S., Pardini, A., Morton, G.J., Ogimoto, K., Schwartz, M.W., und Dempsey, P.J. (2008). Deficiency of TNF-alpha converting enzyme (TACE/ADAM17) causes a lean, hypermetabolic phenotype in mice. *Endocrinology* *149*, 6053–6064.

Gonzales, P.E., Solomon, A., Miller, A.B., Leesnitzer, M.A., Sagi, I., und Milla, M.E. (2004). Inhibition of the tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme by its pro domain. *J. Biol. Chem.* *279*, 31638–31645.

- Groth, E., Pruessmeyer, J., Babendreyer, A., Schu-, J., Pasqualon, T., Dreytmueller, D., Higashiyama, S., Gr, J., Cataldo, D., Ludwig, A., u. a. (2016a). Stimulated release and functional activity of surface expressed metalloproteinase ADAM17 in exosomes. *BBA - Mol. Cell Res.* *1863*, 2795–2808.
- Groth, E., Pruessmeyer, J., Babendreyer, A., Schu-, J., Pasqualon, T., Dreytmueller, D., Higashiyama, S., Gr, J., Cataldo, D., Ludwig, A., u. a. (2016b). Stimulated release and functional activity of surface expressed metalloproteinase ADAM17 in exosomes. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* *1863*, 2795–2808.
- Grubb, S., Poulsen, K.A., Juul, C.A., Kyed, T., Klausen, T.K., Larsen, E.H., und Hoffmann, E.K. (2013). TMEM16F (Anoctamin 6), an anion channel of delayed Ca(2+) activation. *J. Gen. Physiol.* *141*.
- Gurtovenko, A.A., Anwar, J., und Vattulainen, I. (2010). Defect-Mediated Trafficking across Cell Membranes: Insights from *in Silico* Modeling. *Chem. Rev.* *110*, 6077–6103.
- Gutiérrez-López, M.D., Gilsanz, A., Yáñez-Mó, M., Ovalle, S., Lafuente, E.M., Domínguez, C., Monk, P.N., González-Alvaro, I., Sánchez-Madrid, F., und Cabañas, C. (2011). The sheddase activity of ADAM17/TACE is regulated by the tetraspanin CD9. *Cell. Mol. Life Sci.* *68*, 3275–3292.
- Gutwein, P., Keller, S., Rubinstein, E., Stoeck, A., Sanderson, M.P., Le Naour, F., Altevogt, P., Riedle, S., Runz, S., und Ludwig, A. (2006). A role for exosomes in the constitutive and stimulus-induced ectodomain cleavage of L1 and CD44. *Biochem. J.* *393*, 609–618.
- Gyobu, S., Ishihara, K., Suzuki, J., Segawa, K., und Nagata, S. (2017). Characterization of the scrambling domain of the TMEM16 family. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *114*, 6274–6279.
- Hall, K.C., und Blobel, C.P. (2012). Interleukin-1 stimulates ADAM17 through a mechanism independent of its cytoplasmic domain or phosphorylation at threonine 735. *PLoS One* *7*, e31600.
- Hanahan, D., und Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* *144*, 646–674.
- Holthuis, J.C.M., und Levine, T.P. (2005). Lipid traffic: Floppy drives and a superhighway. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *6*, 209–220.

Horiuchi, K., Le Gall, S., Schulte, M., Yamaguchi, T., Reiss, K., Murphy, G., Toyama, Y., Hartmann, D., Saftig, P., und Blobel, C.P. (2007a). Substrate selectivity of epidermal growth factor-receptor ligand sheddases and their regulation by phorbol esters and calcium influx. *Mol. Biol. Cell* *18*, 176–188.

Horiuchi, K., Kimura, T., Miyamoto, T., Takaishi, H., Okada, Y., Toyama, Y., und Blobel, C.P. (2007b). Cutting Edge: TNF- α -Converting Enzyme (TACE/ADAM17) Inactivation in Mouse Myeloid Cells Prevents Lethality from Endotoxin Shock. *J. Immunol.* *179*, 2686–2689.

Hundhausen, C., Misztela, D., Berkhout, T.A., Broadway, N., Saftig, P., Reiss, K., Hartmann, D., Fahrenholz, F., Postina, R., Matthews, V., u. a. (2003). The disintegrin-like metalloproteinase ADAM10 is involved in constitutive cleavage of CX3CL1 (fractalkine) and regulates CX3CL1-mediated cell-cell adhesion. *Blood* *102*, 1186–1195.

Huxley-Jones, J., Clarke, T.K., Beck, C., Toubaris, G., Robertson, D.L., und Boot-Handford, R.P. (2007). The evolution of the vertebrate metzincins; Insights from *Ciona intestinalis* and *Danio rerio*. *BMC Evol. Biol.* *7*, 1–20.

Ishihara, K., Suzuki, J., und Nagata, S. (2016). Role of Ca²⁺ in the Stability and Function of TMEM16F and 16K. *Biochemistry* *55*, 3180–3188.

Juanes, P.P., Ferreira, L., Montero, J.C., Arribas, J., und Pandiella, A. (2005). N-terminal cleavage of proTGF α occurs at the cell surface by a TACE-independent activity. *Biochem. J.* *389*, 161–172.

Karan, D., Lin, F.C., Bryan, M., Ringel, J., Moniaux, N., Lin, M.-F., und Batra, S.K. (2003). Expression of ADAMs (a disintegrin and metalloproteases) and TIMP-3 (tissue inhibitor of metalloproteinase-3) in human prostatic adenocarcinomas. *Int. J. Oncol.* *23*, 1365–1371.

Kasuya, G., Yamaura, T., Ma, X.B., Nakamura, R., Takemoto, M., Nagumo, H., Tanaka, E., Dohmae, N., Nakane, T., Yu, Y., u. a. (2017). Structural insights into the competitive inhibition of the ATP-gated P2X receptor channel. *Nat. Commun.* *8*.

Kiessling, A., Weigle, B., Fuessel, S., Ebner, R., Meye, A., Rieger, M.A., Schmitz, M., Temme, A., Bachmann, M., Wirth, M.P., u. a. (2005). D-TMPP: A novel androgen-regulated gene preferentially expressed in prostate and prostate cancer that is the first characterized member of an eukaryotic gene family. *Prostate* *64*, 387–400.

Kirkpatrick, F.H. (1979). NEW MODELS OF CELLULAR CONTROL: MEMBRANE CYTOSKELETONS, MEMBRANE CURVATURE POTENTIAL, AND POSSIBLE INTERACTIONS. *Biosystems* 11, 93–109.

Kirsch, T., Nah, H.-D., Demuth, D.R., Harrison, G., Golub, E.E., Adams, S.L., und Pacifici, M. (1997). Annexin V-Mediated Calcium Flux across Membranes Is Dependent on the Lipid Composition: Implications for Cartilage Mineralization [†]. *Biochemistry* 36, 3359–3367.

Kobayashi, T., Beuchat, M.-H., Chevallier, J., Makino, A., Mayran, N., Escola, J.-M., Lebrand, C., Cosson, P., Kobayashi, T., und Gruenberg, J. (2002). Separation and characterization of late endosomal membrane domains. *J. Biol. Chem.* 277, 32157–32164.

Kozlosky, C.J., Black, R.A., Johnson, R.S., Paxton, R.J., Boiani, N., Srinivasan, S., March, C.J., Rauch, C.T., Reddy, P., Peschon, J.J., u. a. (1997). A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- α from cells. *Nature* 385, 729–733.

Kraft, M.L. (2013). Plasma membrane organization and function: moving past lipid rafts. *Mol. Biol. Cell* 24, 2765–2768.

Kretz, C.A., Novakovic, V.A., Kiseleva, A., Cleuren, A.C.A., Khoriaty, R., Adams, E., Ginsburg, D., und Gilbert, G.E. (2014). TMEM16F Deficiency Causes a Strain-Dependent Lethality in Mice and Reduced Phosphatidylserine Exposure on Heterozygous As Well As Homozygous Deficient Mouse Platelets. *Blood* 124.

Krunkosky, T.M., Maruo, K., Potempa, J., Jarrett, C.L., und Travis, J. (2005). Inhibition of tumor necrosis factor- α -induced RANTES secretion by alkaline protease in A549 cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 33, 483–489.

Laukoetter, M.G., Nava, P., Lee, W.Y., Severson, E.A., Capaldo, C.T., Babbitt, B.A., Williams, I.R., Koval, M., Peatman, E., Campbell, J.A., u. a. (2007). JAM-A regulates permeability and inflammation in the intestine in vivo. *J. Exp. Med.* 204, 3067–3076.

Lee, M.Y., Nam, K.H., und Choi, K.C. (2016). iRhoms; Its functions and essential roles. *Biomol. Ther.* 24, 109–114.

Lendeckel, U., Kohl, J., Arndt, M., Carl-McGrath, S., Donat, H., und Röcken, C. (2005). Increased expression of ADAM family members in human breast cancer and breast cancer cell lines. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 131, 41–48.

Li, X., Maretzky, T., Weskamp, G., Monette, S., Qing, X., Issuree, P.D.A., Crawford, H.C., McIlwain, D.R., Mak, T.W., Salmon, J.E., u. a. (2015). iRhoms 1 and 2 are essential upstream regulators of ADAM17-dependent EGFR signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *112*, 6080–6085.

Locksley, R.M., Killeen, N., und Lenardo, M.J. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* *104*, 487–501.

Lopez-Marques, R.L., Theorin, L., Palmgren, M.G., und Pomorski, T.G. (2014). P4-ATPases: Lipid flippases in cell membranes. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* *466*, 1227–1240.

Lorenzen, I., Lokau, J., Düsterhöft, S., Trad, A., Garbers, C., Scheller, J., Rose-John, S., und Grötzinger, J. (2012). The membrane-proximal domain of A Disintegrin and Metalloprotease 17 (ADAM17) is responsible for recognition of the interleukin-6 receptor and interleukin-1 receptor II. *FEBS Lett.* *586*, 1093–1100.

Lorenzen, I., Lokau, J., Korpys, Y., Oldefest, M., Flynn, C.M., Künzel, U., Garbers, C., Freeman, M., Grötzinger, J., und Düsterhöft, S. (2016). Control of ADAM17 activity by regulation of its cellular localisation. *Sci. Rep.* *6*, 35067.

Luetkeke, N.C., Qiu, T.H., Peiffer, R.L., Oliver, P., Smithies, O., und Lee, D.C. (1993). TGF alpha deficiency results in hair follicle and eye abnormalities in targeted and waved-1 mice. *Cell* *73*, 263–278.

Mann, G.B., Fowler, K.J., Gabriel, A., Nice, E.C., Williams, R.L., und Dunn, A.R. (1993). Mice with a null mutation of the TGF-alpha gene have abnormal skin architecture, wavy hair, and curly whiskers and often develop corneal inflammation. *Cell* *73*, 249–261.

Marconi, C., Brunamonti Binello, P., Badiali, G., Caci, E., Cusano, R., Garibaldi, J., Pippucci, T., Merlini, A., Marchetti, C., Rhoden, K.J., u. a. (2013). A novel missense mutation in ANO5/TMEM16E is causative for gnathodiaphyseal dysplasia in a large Italian pedigree. *Eur. J. Hum. Genet.* *21*, 613–619.

Maretzky, T., Reiss, K., Ludwig, A., Buchholz, J., Scholz, F., Proksch, E., de Strooper, B., Hartmann, D., und Saftig, P. (2005). ADAM10 mediates E-cadherin shedding and regulates epithelial cell-cell adhesion, migration, and beta-catenin translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 9182–9187.

- Maretzky, T., Evers, A., Zhou, W., Swendeman, S.L., Wong, P.-M., Rafii, S., Reiss, K., und Blobel, C.P. (2011). Migration of growth factor-stimulated epithelial and endothelial cells depends on EGFR transactivation by ADAM17. *Nat. Commun.* *2*, 229.
- Maretzky, T., McIlwain, D.R., Issuree, P.D.A., Li, X., Malapeira, J., Amin, S., Lang, P.A., Mak, T.W., und Blobel, C.P. (2013). iRhom2 controls the substrate selectivity of stimulated ADAM17-dependent ectodomain shedding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 11433–11438.
- Mariño, G., und Kroemer, G. (2013). Mechanisms of apoptotic phosphatidylserine exposure. *Cell Res.* *23*, 1247–1248.
- Martin, S.J., Reutelingsperger, C.P., McGahon, A.J., Rader, J.A., van Schie, R.C., LaFace, D.M., und Green, D.R. (1995). Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J. Exp. Med.* *182*, 1545–1556.
- Matthews, A.L., Noy, P.J., Reyat, J.S., und Tomlinson, M.G. (2016). Regulation of A disintegrin and metalloproteinase (ADAM) family sheddases ADAM10 and ADAM17: The emerging role of tetraspanins and rhomboids. *Platelets* *7104*, 1–9.
- McConnell, H.M., und Kornberg, R.D. (1971). Inside-outside transitions of phospholipids in vesicle membranes. *Biochemistry* *10*, 1111–1120.
- McEver, R.P., Moore, K.L., und Cummings, R.D. (1995). Leukocyte trafficking mediated by selectin-carbohydrate interactions. *J. Biol. Chem.* *270*, 11025–11028.
- McMahan, R.S., Riehle, K.J., Fausto, N., und Campbell, J.S. (2013). A disintegrin and metalloproteinase 17 regulates TNF and TNFR1 levels in inflammation and liver regeneration in mice. *AJP Gastrointest. Liver Physiol.* *305*, G25–G34.
- Mead, J.E., und Fausto, N. (1989). Transforming growth factor alpha may be a physiological regulator of liver regeneration by means of an autocrine mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *86*, 1558–1562.
- van Meer, G., und de Kroon, A.I.P.M. (2011). Lipid map of the mammalian cell. *J. Cell Sci.* *124*, 5–8.

- Merlos-Suárez, A., Ruiz-Paz, S., Baselga, J., und Arribas, J. (2001). Metalloprotease-dependent Protransforming Growth Factor- α Ectodomain Shedding in the Absence of Tumor Necrosis Factor- α -converting Enzyme. *J. Biol. Chem.* 276, 48510–48517.
- Mochizuki, S., und Okada, Y. (2007). ADAMs in cancer cell proliferation and progression. *Cancer Sci.* 98, 621–628.
- Mohan, M.J., Seaton, T., Mitchell, J., Howe, A., Blackburn, K., Burkhart, W., Moyer, M., Patel, I., Waitt, G.M., Becherer, J.D., u. a. (2002). The tumor necrosis factor- α converting enzyme (TACE): A unique metalloproteinase with highly defined substrate selectivity. *Biochemistry* 41, 9462–9469.
- Möller-Hackbarth, K., Dewitz, C., Schweigert, O., Trad, A., Garbers, C., Rose-John, S., und Scheller, J. (2013). A disintegrin and metalloprotease (ADAM) 10 and ADAM17 are major sheddases of T cell immunoglobulin and mucin domain 3 (Tim-3). *J. Biol. Chem.* 288, 34529–34544.
- Montigny, C., Lyons, J., Champeil, P., Nissen, P., und Lenoir, G. (2016). On the molecular mechanism of flippase- and scramblase-mediated phospholipid transport. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1861, 767–783.
- Morelli, A., Chiozzi, P., Chiesa, A., Ferrari, D., Sanz, J.M., Falzoni, S., Pinton, P., Rizzuto, R., Olson, M.F., und Di Virgilio, F. (2003). Extracellular ATP causes ROCK I-dependent bleb formation in P2X7-transfected HEK293 cells. *Mol. Biol. Cell* 14, 2655–2664.
- Moss, M.L., und Lambert, M.H. (2002). Shedding of membrane proteins by ADAM family proteases. *Essays Biochem* 38, 141–53.
- Moss, M.L., und Rasmussen, F.H. (2007). Fluorescent substrates for the proteinases ADAM17, ADAM10, ADAM8, and ADAM12 useful for high-throughput inhibitor screening. *Anal. Biochem.* 366, 144–148.
- Muallem, S., Chung, W.Y., Jha, A., und Ahuja, M. (2017). Lipids at membrane contact sites: cell signaling and ion transport. *EMBO Rep.* 18, 1893–1904.
- Murphy, G. (2008). The ADAMs: signalling scissors in the tumour microenvironment. *Nat. Rev. Cancer* 8, 932–941.

- Murthy, A., Defamie, V., Smookler, D.S., Di Grappa, M.A., Horiuchi, K., Federici, M., Sibilia, M., Blobel, C.P., und Khokha, R. (2010). Ectodomain shedding of EGFR ligands and TNFR1 dictates hepatocyte apoptosis during fulminant hepatitis in mice. *J. Clin. Invest.* *120*, 2731–2744.
- Nagata, S., Suzuki, J., Segawa, K., und Fujii, T. (2016). Exposure of phosphatidylserine on the cell surface. *Cell Death Differ.* *23*, 1–10.
- Nelson, G.J. (1967). Lipid composition of erythrocytes in various mammalian species. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)/Lipids Lipid Metab.* *144*, 221–232.
- Neumann, U., Kubota, H., Frei, K., Ganu, V., und Leppert, D. (2004). Characterization of Mca-Lys-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-NH₂, a fluorogenic substrate with increased specificity constants for collagenases and tumor necrosis factor converting enzyme. *Anal. Biochem.* *328*, 166–173.
- Newton, A.C. (2003). Protein Kinase C : Structure , Function , and Regulation (*). *J. Biol. Chem.* *270*, 1–52.
- Nguyen, D.B., Wagner-britz, L., Maia, S., Steffen, P., Wagner, C., Kaestner, L., und Bernhardt, I. (2011). Regulation of Phosphatidylserine Exposure in Red Blood Cells. *Cell. Physiol. Biochem.* *28*, 847–856.
- Nicolaou, A., Zhao, Z., Northoff, B.H., Sass, K., Herbst, A., Kohlmaier, A., Chalaris, A., Wolfrum, C., Weber, C., Steffens, S., u. a. (2017). *Adam17* Deficiency Promotes Atherosclerosis by Enhanced TNFR2 Signaling in Mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *37*, 247–257.
- Nishizuka, Y. (1988). The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular recognition. *Nature* *334*, 661–665.
- Ousingsawat, J., Wanitchakool, P., Schreiber, R., Wuelling, M., Vortkamp, A., und Kunzelmann, K. (2015). Anoctamin-6 controls bone mineralization by activating the calcium transporter NCX1. *J. Biol. Chem.* *290*, 6270–6280.
- Paulino, C., Neldner, Y., Lam, A.K., Kalienkova, V., Brunner, J.D., Schenck, S., und Dutzler, R. (2017). Structural basis for anion conduction in the calcium-activated chloride channel TMEM16A. *Elife* *6*, 1–23.

- Pearson, K. (1904). *Mathematical Contributions to the Evolution.—XII. On a Generalised Theory of Alternative Inheritance, special Reference to Mendel's Laws.* 203, 385–420.
- Pellegatti, P., Raffaghello, L., Bianchi, G., Piccardi, F., Pistoia, V., und Di Virgilio, F. (2008). Increased level of extracellular ATP at tumor sites: in vivo imaging with plasma membrane luciferase. *PLoS One* 3, e2599.
- Peschon, J.J., Slack, J. I., Reddy, P., Stocking, K.L., Sunnarborg, S.W., Lee, D.C., Russell, W.E., Castner, B.J., Johnson, R.S., Fitzner, J.N., u. a. (1998). An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. *Science* (80-.). 282, 1281–1284.
- Pifferi, S., Cenedese, V., und Menini, A. (2012). Anoctamin 2/TMEM16B: a calcium-activated chloride channel in olfactory transduction. *Exp. Physiol.* 97, 193–199.
- Prenzel, N., Zwick, E., Daub, H., Leserer, M., Abraham, R., Wallasch, C., und Ullrich, A. (1999). EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. *Nature* 402, 884–888.
- Pupovac, A., und Sluyter, R. (2016). Roles of extracellular nucleotides and P2 receptors in ectodomain shedding. *Cell. Mol. Life Sci.* 73, 1–15.
- Raab, G., und Klagsbrun, M. (1997). Heparin-binding EGF-like growth factor. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer* 1333, F179–F199.
- Rady, I., Siddiqui, I.A., Rady, M., und Mukhtar, H. (2017). Melittin, a major peptide component of bee venom, and its conjugates in cancer therapy. *Cancer Lett.* 1, 16–31.
- Rasmussen, H. (1970). Cell communication, calcium ion, and cyclic adenosine monophosphate. *Science* 170, 404–412.
- Rath, P.C., und Aggarwal, B.B. (1999). TNF-Induced Signaling in Apoptosis. *J. Clin. Immunol.* 19, 350–364.
- Reddy, P., Slack, J.L., Davis, R., Cerretti, D.P., Kozlosky, C.J., Blanton, R.A., Shows, D., Peschon, J.J., und Black, R.A. (2000). Functional analysis of the domain structure of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme. *J. Biol. Chem.* 275, 14608–14614.

Reiss, K., Maretzky, T., Ludwig, A., Tousseyn, T., de Strooper, B., Hartmann, D., und Saftig, P. (2005). ADAM10 cleavage of N-cadherin and regulation of cell-cell adhesion and beta-catenin nuclear signalling. *EMBO J.* 24, 742–752.

Robinson, P.J. (1992). Differential stimulation of protein kinase C activity by phorbol ester or calcium/phosphatidylserine in vitro and in intact synaptosomes. *J. Biol. Chem.* 267, 21637–21644.

Rose-John, S. (2012). IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: importance for the pro-inflammatory activities of IL-6. *Int. J. Biol. Sci.* 8, 1237–1247.

Saftig, P., und Reiss, K. (2011). The „A Disintegrin And Metalloproteases“ ADAM10 and ADAM17: Novel drug targets with therapeutic potential? *Eur. J. Cell Biol.* 90, 527–535.

Sahin, U., Weskamp, G., Kelly, K., Zhou, H.-M., Higashiyama, S., Peschon, J., Hartmann, D., Saftig, P., und Blobel, C.P. (2004). Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands. *J. Cell Biol.* 164, 769–779.

Sakuragi, T., Kosako, H., und Nagata, S. (2019). Phosphorylation-mediated activation of mouse Xkr8 scramblase for phosphatidylserine exposure. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 116, 201820499.

Sanger, F., Nicklen, S., und Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74, 5463–5467.

Schäfer, B., Gschwind, A., und Ullrich, A. (2004). Multiple G-protein-coupled receptor signals converge on the epidermal growth factor receptor to promote migration and invasion. *Oncogene* 23, 991–999.

Scheller, J., Chalaris, A., Garbers, C., und Rose-John, S. (2011). ADAM17: A molecular switch to control inflammation and tissue regeneration. *Trends Immunol.* 32, 380–387.

Schmidt, S., Schumacher, N., Schwarz, J., Tangemann, S., Kenner, L., Schleder, M., Sibila, M., Linder, M., Altendorf-Hoffman, A., Knosel, T., u. a. (2018). ADAM17 is required for EGF-R – induced intestinal tumors via IL-6 trans-signaling. *J. Exp. Med.* 1–21.

Schreiber, R., Uliyakina, I., Kongsuphol, P., Warth, R., Mirza, M., Martins, J.R., und Kunzelmann, K. (2010). Expression and function of epithelial anoctamins. *J. Biol. Chem.* 285, 7838–7845.

- Schreiber, R., Ousingsawat, J., Wanitchakool, P., Sirianant, L., Benedetto, R., Reiss, K., und Kunzelmann, K. (2018). Regulation of TMEM16A/ANO1 and TMEM16F/ANO6 ion currents and phospholipid scrambling by Ca²⁺ and plasma membrane lipid. *J. Physiol.* 596, 217–229.
- Schulte, A., Schulz, B., Andrzejewski, M.G., Hundhausen, C., Mletzko, S., Achilles, J., Reiss, K., Paliga, K., Weber, C., Rose John, S., u. a. (2007). Sequential processing of the transmembrane chemokines CX3CL1 and CXCL16 by α - and γ -secretases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 358, 233–240.
- Schwarz, J., Broder, C., Helmstetter, A., Schmidt, S., Yan, I., Müller, M., Schmidt-Arras, D., Becker-Pauly, C., Koch-Nolte, F., Mittrücker, H.W., u. a. (2013). Short-term TNF alpha shedding is independent of cytoplasmic phosphorylation or furin cleavage of ADAM17. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1833, 3355–3367.
- Scudieri, P., Sondo, E., Ferrera, L., und Galletta, L.J. V. (2012). The anoctamin family: TMEM16A and TMEM16B as calcium-activated chloride channels. *Exp. Physiol.* 97, 177–183.
- Scudieri, P., Caci, E., Venturini, A., Sondo, E., Pianigiani, G., Marchetti, C., Ravazzolo, R., Pagani, F., und Galletta, L.J.V. (2015). Ion channel and lipid scramblase activity associated with expression of TMEM16F/ANO6 isoforms. *J. Physiol.* 593, 3829–3848.
- Sebastian, T.T., Baldrige, R.D., Xu, P., und Graham, T.R. (2012). Phospholipid flippases: building asymmetric membranes and transport vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 1821, 1068–1077.
- Segawa, K., und Nagata, S. (2015). An Apoptotic 'Eat Me' Signal: Phosphatidylserine Exposure. *Trends Cell Biol.* 25, 639–650.
- Segawa, K., Suzuki, J., und Nagata, S. (2012). Constitutive exposure of phosphatidylserine on viable cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 995–995.
- Seigneuret, M., und Devaux, P.F. (1984). ATP-dependent asymmetric distribution of spin-labeled phospholipids in the erythrocyte membrane: Relation to shape changes (phospholipid asymmetry/transverse diffusion/erythrocyte shape/bilayer couple/electron spin resonance). *Cell Biol.* 81, 3751–3755.

Sezgin, E., Levental, I., Mayor, S., und Eggeling, C. (2017). The mystery of membrane organization: composition, regulation and roles of lipid rafts. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *18*, 361–374.

Sharma, B., und Kanwar, S.S. (2018). Phosphatidylserine: A cancer cell targeting biomarker. *Semin. Cancer Biol.* *52*, 17–25.

Simons, K., und Gerl, M.J. (2010). Revitalizing membrane rafts: new tools and insights. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *11*, 688–699.

Simons, K., und Toomre, D. (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *1*, 31–39.

Singer, S.J., Nicolson, G.L., S. J., S., und Garth L., N. (1972). The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes. *Science (80-)*. *175*, 720–731.

Sivagnanam, U., Palanirajan, S.K., und Gummadi, S.N. (2017). The role of human phospholipid scramblases in apoptosis: An overview. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* *1864*, 2261–2271.

Sommer, A., Fries, A., Cornelsen, I., Speck, N., Koch-Nolte, F., Gimpl, G., Andr??, J., Bhakdi, S., und Reiss, K. (2012). Melittin modulates keratinocyte function through P2 receptor-dependent ADAM activation. *J. Biol. Chem.* *287*, 23678–23689.

Sommer, A., Kordowski, F., Büch, J., Maretzky, T., Evers, A., Andrä, J., Düsterhöft, S., Michalek, M., Lorenzen, I., Somasundaram, P., u. a. (2016a). Phosphatidylserine exposure is required for ADAM17 sheddase function. *Nat. Commun.* *7*.

Sommer, A., Bhakdi, S., und Reiss, K. (2016b). How membrane asymmetry regulates ADAM17 sheddase function. *Cell Cycle* *15*, 2995–2996.

Sommer, A., Düppe, M., Baumecker, L., Kordowski, F., Büch, J., Chico, J.F., Fritsch, J., Schütze, S., Adam, D., Sperrhacker, M., u. a. (2017). Extracellular sphingomyelinase activity impairs TNF- α -induced endothelial cell death via ADAM17 activation and TNF receptor 1 shedding. *J. Biol. Chem.* *292*, 72584–72596.

Spector, A.A., und Yorek, M.A. (1985). Membrane lipid composition and cellular function. *J. Lipid Res.* *26*, 1015–1035.

- Srour, N., Lebel, A., McMahon, S., Fournier, I., Fugère, M., Day, R., und Dubois, C.M. (2003). TACE/ADAM-17 maturation and activation of sheddase activity require proprotein convertase activity. *FEBS Lett.* 554, 275–283.
- Stepanenko, A.A., und Heng, H.H. (2017). Transient and stable vector transfection: Pitfalls, off-target effects, artifacts. *Mutat. Res. - Rev. Mutat. Res.* 773, 91–103.
- Stewart, T.A., Yapa, K.T.D.S., und Monteith, G.R. (2015). Altered calcium signaling in cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1848, 2502–2511.
- Stohr, H., Heisig, J.B., Benz, P.M., Schoberl, S., Milenkovic, V.M., Strauss, O., Aartsen, W.M., Wijnholds, J., Weber, B.H.F., und Schulz, H.L. (2009). TMEM16B, A Novel Protein with Calcium-Dependent Chloride Channel Activity, Associates with a Presynaptic Protein Complex in Photoreceptor Terminals. *J. Neurosci.* 29, 6809–6818.
- Stolz, M., Klapperstück, M., Kendzierski, T., Detro-dassen, S., Panning, A., Schmalzing, G., und Markwardt, F. (2015). Homodimeric anoctamin-1, but not homodimeric anoctamin-6, is activated by calcium increases mediated by the P2Y1 and P2X7 receptors. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* 467, 2121–2140.
- Strick-Marchand, H., und Weiss, M.C. (2003). Embryonic liver cells and permanent lines as models for hepatocyte and bile duct cell differentiation. *Mech. Dev.* 120, 89–98.
- Suzuki, J., Fujii, T., Imao, T., Ishihara, K., Kuba, H., und Nagata, S. (2013). Calcium-dependent Phospholipid Scramblase Activity of TMEM16 Protein Family Members. *J. Biol. Chem.* 288, 13305–13316.
- Swendeman, S., Mendelson, K., Weskamp, G., Horiuchi, K., Deutsch, U., Scherle, P., Hooper, A., Rafii, S., und Blobel, C.P. (2008). VEGF-A stimulates ADAM17-dependent shedding of VEGFR2 and crosstalk between VEGFR2 and ERK signaling. *Circ. Res.* 103, 916–918.
- Tian, Y., Schreiber, R., und Kunzelmann, K. (2012). Anoctamins are a family of Ca²⁺-activated Cl⁻ channels. *J. Cell Sci.* 125, 4991–4998.
- Tsao, H.K., Chiu, P.H., und Sun, S.H. (2013). PKC-dependent ERK phosphorylation is essential for P2X7 receptor-mediated neuronal differentiation of neural progenitor cells. *Cell Death Dis.* 4, e751-11.

Tsukerman, P., Eisenstein, E.M., Chavkin, M., Schmiedel, D., Wong, E., Werner, M., Yaacov, B., Averbuch, D., Molho-Pessach, V., Stepensky, P., u. a. (2015). Cytokine secretion and NK cell activity in human ADAM17 deficiency. *6*.

Tu, W.-C., Wu, C.-C., Hsieh, H.-L., Chen, C.-Y., und Hsu, S.-L. (2008). Honeybee venom induces calcium-dependent but caspase-independent apoptotic cell death in human melanoma A2058 cells. *Toxicon* 52, 318–329.

Vallabhapurapu, S.D., Blanco, V.M., Sulaiman, M.K., Vallabhapurapu, S.L., Chu, Z., Franco, R.S., und Qi, X. (2015). Variation in human cancer cell external phosphatidylserine is regulated by flippase activity and intracellular calcium. *Oncotarget* 6, 34375–34388.

Verdaguer, N., Corbalan-Garcia, S., Ochoa, W.F., Fita, I., und Gómez-Fernández, J.C. (1999). Ca²⁺ bridges the C2 membrane-binding domain of protein kinase C α directly to phosphatidylserine. *EMBO J.* 18, 6329–6338.

Verkleij, A.J., Zwaal, R.F.A., Roelofsen, B., Comfurius, P., Kastelijn, D., und van Deenen, L.L.M. (1973). The asymmetric distribution of phospholipids in the human red cell membrane. A combined study using phospholipases and freeze-etch electron microscopy. *BBA - Biomembr.* 323, 178–193.

Vidlickova, I., Dequiedt, F., Jelenska, L., Sedlakova, O., Pastorek, M., Stuchlik, S., Pastorek, J., Zatovicova, M., und Pastorekova, S. (2016). Apoptosis-induced ectodomain shedding of hypoxia-regulated carbonic anhydrase IX from tumor cells: a double-edged response to chemotherapy. *BMC Cancer* 16, 239.

Di Virgilio, F., Pinton, P., und Falzoni, S. (2016). Assessing Extracellular ATP as Danger Signal In Vivo: The pmLuc System. (Humana Press, New York, NY), S. 115–129.

Weber, S., und Saftig, P. (2012). Ectodomain shedding and ADAMs in development. *Development* 139, 3693–3709.

White, J.M. (2003). ADAMs: modulators of cell–cell and cell–matrix interactions. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15, 598–606.

De Witt, S.M., Verdoold, R., Cosemans, J.M.E.M.E.M., und Heemskerk, J.W.M.M. (2014). Insights into platelet-based control of coagulation. *Thromb. Res.* 133, S139–S148.

- Wojcikiewicz, E.P., Koenen, R.R., Fraemohs, L., Minkiewicz, J., Azad, H., Weber, C., und Moy, V.T. (2009). LFA-1 Binding Destabilizes the JAM-A Homophilic Interaction During Leukocyte Transmigration. *Biophys. J.* *96*, 285–293.
- Wolfs, J.L.N., Comfurius, P., Rasmussen, J.T., Keuren, J.F.W., Lindhout, T., Zwaal, R.F.A., und Bevers, E.M. (2005). Activated scramblase and inhibited aminophospholipid translocase cause phosphatidylserine exposure in a distinct platelet fraction. *Cell. Mol. Life Sci.* *62*, 1514–1525.
- Wolfsberg, T.G., Straight, P.D., Gerena, R.L., Huovila, A.-P.J., Primakoff, P., Myles, D.G., und White, J.M. (1995). ADAM, a Widely Distributed and Developmentally Regulated Gene Family Encoding Membrane Proteins with A_Disintegrin A_Nd M_{ET}alloprotease Domain. *Dev. Biol.* *169*, 378–383.
- Wu, L.N.Y., Genge, B.R., und Wuthier, R.E. (2008). Analysis and molecular modeling of the formation, structure, and activity of the phosphatidylserine-calcium-phosphate complex associated with biomineralization. *J. Biol. Chem.* *283*, 3827–3838.
- Xia, M., Xue, S.-B., und Xu, C.-S. (2002). Shedding of TNFR1 in regenerative liver can be induced with TNF alpha and PMA. *World J. Gastroenterol.* *8*, 1129–1133.
- Yang, H., Kim, A., David, T., Palmer, D., Jin, T., Tien, J., Huang, F., Cheng, T., Coughlin, S.R., Jan, Y.N., u. a. (2012). TMEM16F Forms a Ca²⁺-Activated Cation Channel Required for Lipid Scrambling in Platelets during Blood Coagulation. *Cell* *151*, 111–122.
- Yu, J., Fischman, D.A., und Steck, T.L. (1973). Selective solubilization of proteins and phospholipids from red blood cell membranes by nonionic detergents. *J. Supramol. Cell. Biochem.* *1*, 233–248.
- Yu, K., Whitlock, J.M., Lee, K., Ortlund, E. a, Yuan Cui, Y., und Hartzell, H.C. (2015). Identification of a lipid scrambling domain in ANO6/TMEM16F. *Elife* *4*, 1–23.
- Zhao, L., Bi, Y., Kou, J., Shi, J., und Piao, D. (2016). Phosphatidylserine exposing-platelets and microparticles promote procoagulant activity in colon cancer patients. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* *35*, 54.
- Zunke, F., und Rose-John, S. (2017). The shedding protease ADAM17: Physiology and pathophysiology. *BBA - Mol. Cell Res.* 1–12.

Zwaal, R.F., Comfurius, P., und Bevers, E.M. (2004). Scott syndrome, a bleeding disorder caused by defective scrambling of membrane phospholipids. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1636, 119–128.

9 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Mechanismen zum Aufbau und der Aufrechterhaltung der Zellmembran-Asymmetrie.	3
Abbildung 2: Lokalisation der Scrambling-Domäne innerhalb von Anoctamin-6.	8
Abbildung 3: Mechanismus der kalziumabhängigen Phosphatidylserin-Exposition durch Anoctamin-6.	9
Abbildung 4: Klassifizierung der Zink-Metalloproteasen.	10
Abbildung 5: Domänenstruktur der ADAMs.	11
Abbildung 6: Aktivierungsmechanismus des ADAM17-vermittelten Substrat-Sheddings.	13
Abbildung 7: Mutationsstrategie zur Erzeugung des ADAM17-3x Mausmodells.	26
Abbildung 8: Schematische Darstellung der Aktivierung der Scramblase-Aktivität von Anoctamin-6-eGFP und der Shedding-Aktivität von ADAM17.	46
Abbildung 9: Anoctamin-6 erhöht kalziumabhängig die Phosphatidylserin-Externalisierung in HEK293T-Zellen.	47
Abbildung 10: Anoctamin-6 erhöht Kalzium- und Phosphatidylserin-abhängig die Freisetzung von AREG und TGF-alpha.	50
Abbildung 11: Einfluss der Scramblase-Domäne von Anoctamin-6 auf das ADAM-vermittelte Shedding.	53
Abbildung 12: Melittin und ATP erhöhen in Abhängigkeit von Anoctamin-6 das AREG- und TGF-alpha-Shedding.	55
Abbildung 13: ANO6-Überexpression hat keinen Einfluss auf AREG- und TGF-alpha-Shedding unter PMA-Stimulation.	57
Abbildung 14: Das Anoctamin-6-D408G-Modell.	59
Abbildung 15: Charakterisierung der Anoctamin-6-D408G-Mutante.	60
Abbildung 16: Die konstitutiv aktive Mutante Anoctamin-6 D408G erhöht die Freisetzung von AREG- und TGF-alpha.	62
Abbildung 17: Schematische Darstellung des ADAM17-3x Modells.	64
Abbildung 18: Phänotyp und Genotyp von ADAM17-3x-Embryonen am E14.	66
Abbildung 19: ADAM17 Expression verschiedener Organe.	67
Abbildung 20: ADAM17-Expression in kultivierten ADAM17-3x-Zelllinien.	68
Abbildung 21: ADAM10-Expression in verschiedenen Geweben und Zelllinien von ADAM17-3x-Mäusen.	69

Abbildung 22: PMA-Stimulation führt zu einer Phosphatidylserin-Externalisierung in MEH. 71

Abbildung 23: TNFR1-Shedding und Spaltung des löslichen fluorogenen ADAM17-Substrats in MEH 72

Abbildung 24: Aktivierung der ADAM17-vermittelten Substratfreisetzung durch Anoctamin-6. 79

Abbildung 25: Sequenzhomologie von Anoctamin-1 und Anoctamin-6.XXV

Abbildung 26: Vektorkarte pcDNA3.1 Anoctamin-6-eGFP.XXVI

Abbildung 27: Sequenzhomologie von murinem und humanem Anoctamin-6.....XXVII

Abbildung 28: Sequenzierung der Punktmutation D408G in verschiedenen Konstrukten..... XXVIII

Abbildung 29: Sequenzierung verschiedener Genotypen des ADAM17-3x-Mausmodells. XXIX

10 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Verteilung der Phospholipide innerhalb der Zellmembran	2
Tabelle 2: Mitglieder der Anoctamin/TMEM16-Familie und deren Bedeutung	6
Tabelle 3: Ausgewählte ADAM-Substrate und deren Bedeutung	14
Tabelle 4: Ausgewählte ADAM17-defiziente Mausmodelle	16
Tabelle 5: Verbrauchsmaterialien	18
Tabelle 6: Chemikalien	19
Tabelle 7: Enzyme	21
Tabelle 8: Kits	22
Tabelle 9: Geräte	22
Tabelle 10: Primäre Antikörper	23
Tabelle 11: Sekundäre Antikörper	24
Tabelle 12: Plasmide	24
Tabelle 13: Software	25
Tabelle 14: Inhibitoren und Stimulanzen	32
Tabelle 15: Verteilung der Genotypen zu verschiedenen Zeitpunkten	65

11.2 VEKTORKARTE pcDNA3.1 ANOCTAMIN-6-EGFP

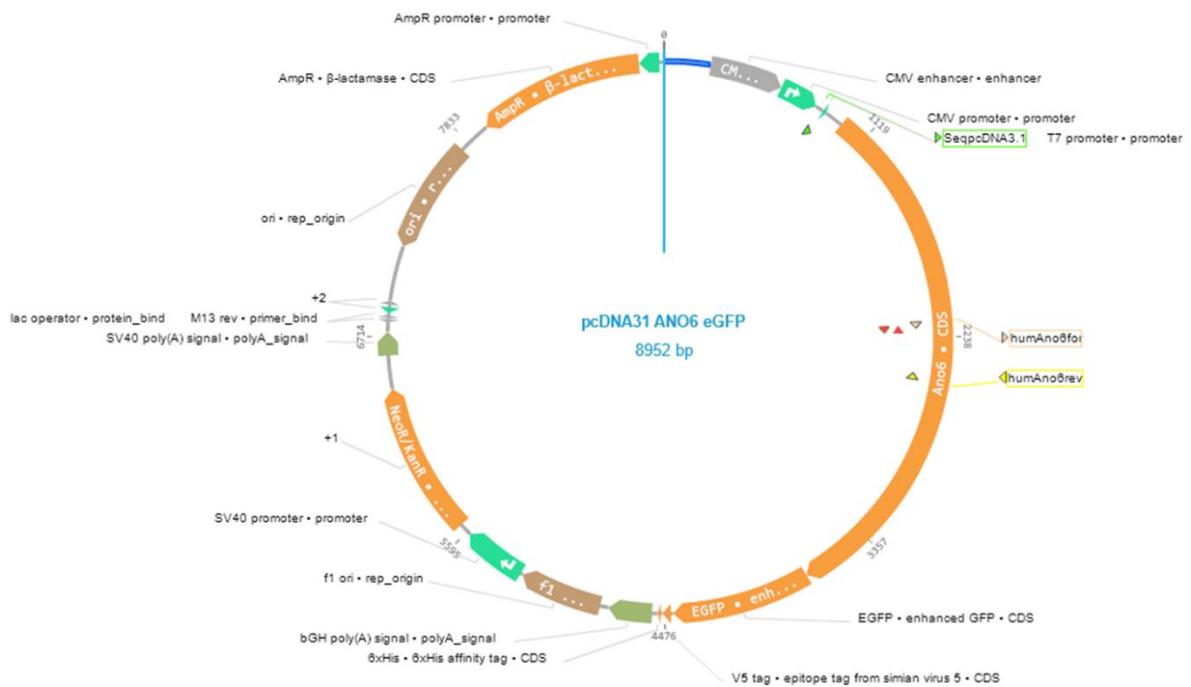


Abbildung 26: Vektorkarte pcDNA3.1 Anoctamin-6-eGFP. Erstellt mit Genome Compiler Version 2.2.88

11.3 SEQUENZHOMOLOGIE ZWISCHEN MURINEM UND HUMANEN ANOCTAMIN-6

```

ANO6_MOUSE      MQMMTRKVLNMELEEDDEDGDIVLENFDQTI VCPFTFGSLENQQDFRTPEFEEFNGKPD 60
ANO6_HUMAN      MKKMSRNVLLQMEEE-EDDDGDIVLENLQGTI-VPDLGSLESQHDFRTPEFEEFNGKPD 58
*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

ANO6_MOUSE      SLFFTDGQRRIDFVLVYEDESKKENNKKGTNEKQKRKRQAYESNLICHGLQLEATRVSVD 120
ANO6_HUMAN      SLFFNDGQRRIDFVLVYEDESRKETNKKGTNEKQRRKRQAYESNLICHGLQLEATRVLVD 118
*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

ANO6_MOUSE      DKLVFVKVHAPWEVLCTYAEIMHIKPLKPNLTKTR-SFPGLNWNFTKVLRVNESVIKPE 179
ANO6_HUMAN      DKLVFVKVHAPWEVLCTYAEIMHIKPLKPNLKNRSSAFGLNWNFTKVLSDVESIIKPE 178
*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

ANO6_MOUSE      QEFFTAPFEKSRMNDFYILDRDSFFNPATRSRIVYFILSRVKYQVMNNVNFKFGINRLVSS 239
ANO6_HUMAN      QEFFTAPFEKSRMNDFYIVDRDAFFNPATRSRIVYFILSRVKYQVINNVSKFGINRLVNS 238
*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

ANO6_MOUSE      GIYKAAFPLHDCRFNYESEDISCPSEYLLYREWAHPRSIIYKKQPLDLIRKYYGEKIGIY 299
ANO6_HUMAN      GIYKAAFPLHDCRFNRQSEDPSPNERYLLYREWAHPRSIIYKKQPLDLIRKYYGEKIGIY 298
*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

ANO6_MOUSE      FAWLGYYTQMLLLAAVVGACFLYGYLDQDNCTWSKEVCDPDIGGQILMCPQCDRLCPFW 359
ANO6_HUMAN      FAWLGYYTQMLLLAAVVGACFLYGYLDQDNCTWSKEVCHPDIGGKIIMCPQCDRLCPFW 358
*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

ANO6_MOUSE      RLNITCESSKKL CIFDSFGTLIFAVFMGVWVTLFLEFWKRRQAELEYEWDTVELQQEEQA 419
ANO6_HUMAN      RLNITCESSKKL CIFDSFGTLIFAVFMGVWVTLFLEFWKRRQAELEYEWDTVELQQEEQA 418
*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

ANO6_MOUSE      RPEYEAQC�NHVVINEITQEERIPFTTCGKCI RVTLCASAVFFWILLIIASVIGIIVYRL 479
ANO6_HUMAN      RPEYEAQC�NHVVINEITQEERIPFTAWGKCI RVTLCASAVFFWILLIIASVIGIIVYRL 478
*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

ANO6_MOUSE      SVFIVFSTLTKPNPNGTDPIQKYLTPQMATSITASIIISFIIIMILNTIYEKVAIMITNFE 539
ANO6_HUMAN      SVFIVFSAKLPKNINGTDPIQKYLTPQTATSITASIIISFIIIMILNTIYEKVAIMITNFE 538
*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

ANO6_MOUSE      LPRTQTDYENSLTMKMF LFQFVNYSSCFYIAFFKGFVGYPGDPVYLLGKYRSEECDPG 599
ANO6_HUMAN      LPRTQTDYENSLTMKMF LFQFVNYSSCFYIAFFKGFVGYPGDPVYLLGKYRNEECDPG 598
*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

ANO6_MOUSE      GCLELTTQLTIIMGGKAIWNNIQEVLLPWVNMNLIGRYKRVSGSEKITPRWEQDYHLQPM 659
ANO6_HUMAN      GCLELTTQLTIIMGGKAIWNNIQEVLLPWVNMNLIGRFHRVSGSEKITPRWEQDYHLQPM 658
*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

ANO6_MOUSE      GKLGLFYEYLEMI IQFGFVTLFVASFPLAPLLALVNNILEIRVDAWKLTTQFRRMVPEKA 719
ANO6_HUMAN      GKLGLFYEYLEMI IQFGFVTLFVASFPLAPLLALVNNILEIRVDAWKLTTQFRRLVPEKA 718
*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

ANO6_MOUSE      QDIGAWQPI MQGIIALAVVTNAMI IAF TSDMI PRLVYYSFSPYPPYGDHTYTYTMDGYINN 779
ANO6_HUMAN      QDIGAWQPI MQGIIALAVVTNAMI IAF TSDMI PRLVYYSFSPYPPYGDHTSYTYTMEGYINN 778
*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

ANO6_MOUSE      TLSVFNITDFKNTDKNENPYIGLGNITLCRYRDFRNPPGHPQEYKHNIIYWHVIAAKLAFI 839
ANO6_HUMAN      TLSIFKVADFKNKSKGNPYSDLGNTTCRYRDFRYPPGHPQEYKHNIIYWHVIAAKLAFI 838
*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

ANO6_MOUSE      IVMEHIIYSVKFFISYAI PDVSKITKSKIKREKYLTKQLLHSHLKD LTKNMGIIAERIG 899
ANO6_HUMAN      IVMEHVIIYSVKFFISYAI PDVSKRTKSKIQREKYLTKQLLHENHLKDMTKNMGVIAERMI 898
*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

ANO6_MOUSE      GTVDNSVRPKLE          911
ANO6_HUMAN      EAVDNNLRPKSE          910
*:*:*:*:*:*

```

Abbildung 27: Sequenzhomologie von murinem und humanem Anoctamin-6. Aminosäuresequenzen basieren auf der Datenbank UniProt. Murines Anoctamin-6 (Q6P9J9-1) und humanes Anoctamin-6 (Q4KMQ2-1) dargestellt und analysiert mit Clustal O Version 1.2.4. * steht für eine übereinstimmende Aminosäure; „:“ steht für eine ähnliche Übereinstimmung > 0,5 nach der Gonnet PAM 250 Matrix; „.“ steht für eine ähnliche Übereinstimmung ≤ 0,5 nach der Gonnet PAM 250 Matrix

11.4 SEQUENZIERUNG DER ANOCTAMIN-6-D408G-MUTANTEN

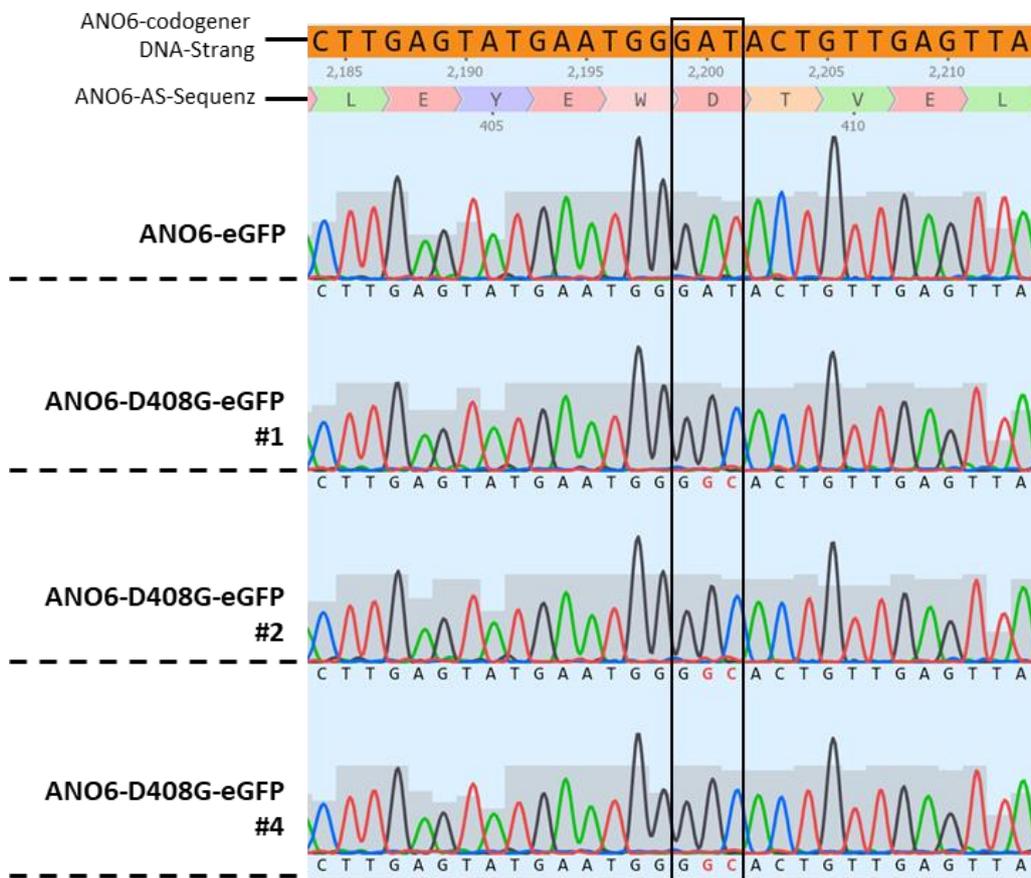


Abbildung 28: Sequenzierung der Punktmutation D408G in verschiedenen Konstrukten. Erstellt mit Genome Compiler Version 2.2.88; Dargestellt sind Übereinstimmungen (schwarz) und Unterschiede (rot) innerhalb der Basenparsequenz verglichener Konstrukte. Die Farbe der Kurve indiziert die vorhandenen Nukleinbasen Adenin (grün), Thymin (rot), Guanin (schwarz) und Cytosin (blau).

11.5 ADAM17-3x-MAUSMODELL

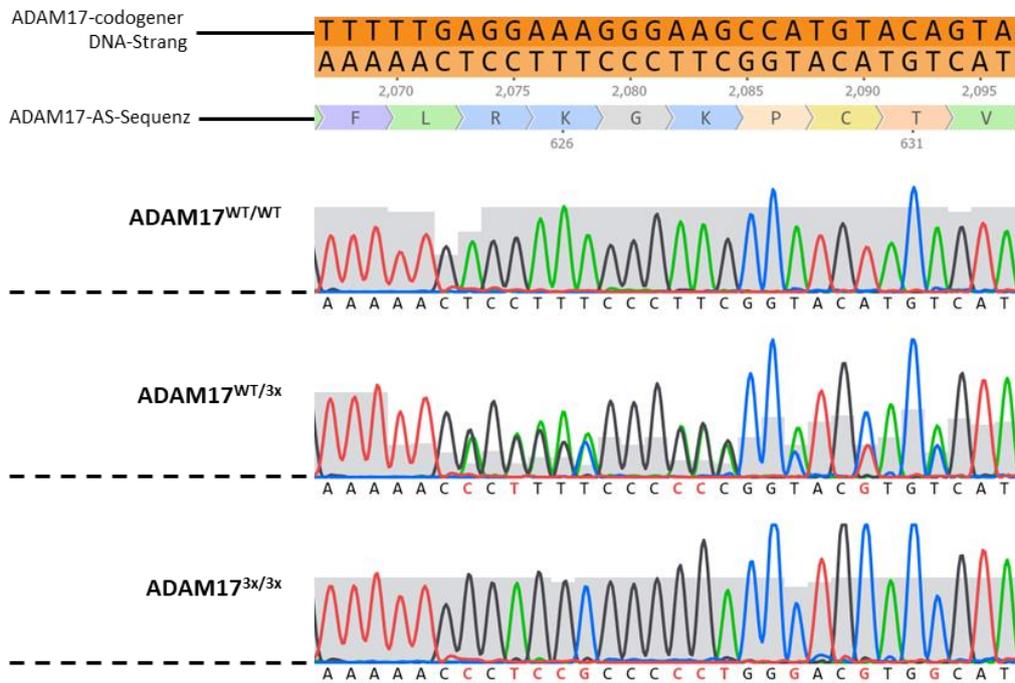


Abbildung 29: Sequenzierung verschiedener Genotypen des ADAM17-3x-Mausmodells. Erstellt mit Genome Compiler Version 2.2.88; Dargestellt sind Übereinstimmungen (schwarz) und Unterschiede (rot) innerhalb der Basenparsequenz verglichener Konstrukte. Die Farbe der Kurve indiziert die vorhandenen Nukleinbasen Adenin (grün), Thymin (rot), Guanin (schwarz) und Cytosin (blau).

12 PUBLIKATIONEN

Anoctamin-6 regulates ADAM sheddase function

Martin Veit, Katharina Isabelle Koyro, Björn Ahrens, Florian Bleibaum, Martin Munz, Hagen Rövekamp, Jörg Andrä, Rainer Schreiber, Karl Kunzelmann, Anselm Sommer, Sucharit Bhakdi, Karina Reiss (2018)

Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res. 1865, 1598–1610 (PMID: 30327201)

ADAM10 sheddase activation is controlled by cell membrane asymmetry

Florian Bleibaum, Anselm Sommer, **Martin Veit**, Jörg Andrä, Karl Kunzelmann, Christian Nehls, Wilmar Correa, Thomas Gutschmann, Joachim Gröttinger, Sucharit Bhakdi, Karina Reiss (2019)

J. Mol. Cell Biol. (PMID: 30753537)

Weitere Daten dieser Dissertation werden zur Einreichung in einem *peer-reviewed* Journal vorbereitet:

Targeted mutagenesis of the ADAM17-phosphatidylserine-binding motif leads to embryonic lethality in mice

Martin Veit, Björn Ahrens, Anselm Sommer, Maria Sperrhacker, Joachim Gröttinger, Sucharit Bhakdi, Karina Reiss

13 ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, Martin Veit, dass ich die vorliegende Arbeit – abgesehen von der wissenschaftlichen Beratung durch meine akademischen Betreuer und Betreuerinnen – selbstständig und nur mit den von mir angegebenen Quellen und Hilfsmitteln verfasst habe.

Die vorliegende Arbeit entstand unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG). Die Arbeit wurde bisher an keiner anderen Universität zur Begutachtung im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt. Des Weiteren habe ich an keiner anderen Hochschule oder keiner anderen Fakultät dieser Hochschule ein Promotionsvorhaben endgültig nicht bestanden und mir wurde noch kein akademischer Grad entzogen.

Teile dieser Arbeit wurden in folgenden Artikeln veröffentlicht:

Anoctamin-6 regulates ADAM sheddase function

Martin Veit, Katharina Isabelle Koyro, Björn Ahrens, Florian Bleibaum, Martin Munz, Hagen Rövekamp, Jörg Andrä, Rainer Schreiber, Karl Kunzelmann, Anselm Sommer, Sucharit Bhakdi, Karina Reiss (2018)

ADAM10 sheddase activation is controlled by cell membrane asymmetry

Florian Bleibaum, Anselm Sommer, **Martin Veit**, Jörg Andrä, Karl Kunzelmann, Christian Nehls, Wilmar Correa, Thomas Gutschmann, Joachim Gröttinger, Sucharit Bhakdi, Karina Reiss (2019)

Ort, Datum

Martin Veit